Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

WECHSELWIRKUNGEN MEMBRANAKTIVER SERUMBESTANDTEILE MIT DER LECITHINMEMBRAN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät (Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Tilmann Kirschner
aus Esslingen am Neckar

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543904_0091

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

WECHSELWIRKUNGEN MEMBRANAKTIVER SERUMBESTANDTEILE MIT DER LECITHINMEMBRAN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät (Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Tilmann Kirschner
aus Esslingen am Neckar

1986

Dekan:	Professor Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter:	Professor Dr. Dr. K. Schmidt
2. Berichterstatter:	Professor Dr. L. Koslowski

meinen Eltern

Abkürzungen

AG	Antigen
AK	Antikörper
BLM	black lipid membrane
C3bINA	C3b-Inaktivator
C4bINA	C4b-Inaktivator
C1qINH	C1q-Inhibitor
MAC	membrane attack complex
MHD	minimum hemolytic dose
MLW	Membranleerwert
NeF	nephritic factor
WW	Wechselwirkung

1.1. Einleitung 1

1.2. Membranen 2
1.2.1. Aufbau biologischer Membranen 2
1.2.2. Lipide 4
1.2.3. Lipide in wässrigem Medium 5
1.2.3.1. Micellen 6
1.2.3.2. Bimolekulare, lamellare Lipid-Membranen 6

1.3. Komplement 7
1.3.1. Terminologie 9
1.3.2.1. Der klassische Komplementweg 13
1.3.2.2. Der alternative Komplementweg 14
1.3.2.3. Der terminale Komplementweg und Komplement-Membran-Wechselwirkungen 16
1.3.3. Reaktionsschritte des klassischen Wegs 17
1.3.3.1. Die AGAK-Reaktion 17
1.3.3.2. Konfigurationsänderung des AK und C1q-Aktivierung 19
1.3.3.3. C1-Aktivierung 19
1.3.3.4. C4-Aktivierung 20
1.3.3.5. C2-Aktivierung, Bildung der klassischen C3-Konvertase 20
1.3.3.6. C3-Aktivierung, Bildung der klassischen C5-Konvertase 21
1.3.3.7. Schema 22
1.3.3.8. Kontrolle des klassischen Komplementwegs 23
1.3.4. Reaktionsschritte des alternativen Wegs 24
1.3.4.1. Initialreaktion des alternativen Wegs 24
1.3.4.2. Aktivierung des alternativen Wegs 25
1.3.4.3. Sekundärreaktion, Leistungsphase 27
1.3.3.4. Schema 28
1.3.4.5. Stabilisierung der alternativen C3-Konvertase durch NeF (nephritic factor) 29
1.3.4.6. Kontrolle des alternativen Wegs 29
1.3.4.7. Aktivität der Spaltprodukte C3a und C5a 30
1.3.5. Reaktionsschritte des Terminalwegs 31
1.3.5.1. C5-Aktivierung, Stabilisierung durch C6, Membraninteraktion des C5b6-Komplexes 32
1.3.5.2. Der C5b67-Komplex 33
1.3.5.3. C5b678 und C5b6789 34
1.3.6. Evolution des Komplementsystems 34

2.1. Das experimentelle Modell 36

2.2.1. Die Lecithinmembran als Membranleerwert 37
2.2.2. WW Valinomyzin - Lecithinmembran als (qualitative) positive Kontrolle 39
2.2.3. WW Serum - Lecithinmembran 40
2.2.3.1. Meerschweinchenserum 41
2.2.3.2. WW Serum von Ratte - Lecithinmembran 41
2.2.3.3. Humanserum 42
2.2.4. WW nativer Serumbestandteile mit der Lecithinmembran 46
2.2.4.1. WW Albumin - Lecithinmembran 46
2.2.4.2. WW Human-IgG - Lecithinmembran 47

2.2.4.3. WW Komplement - Lecithinmembran 48
2.2.5. Komplementaktivierung in vitro 49
2.2.5.1. Leerwerte 49
2.2.5.2. Komplementaktivierung 54
2.2.6. Untersuchung pathologischer Seren 58

2.3. Interpretation der Meßwerte 60
2.3.1. Membranleerwert 60
2.3.2. Beurteilung von Effekten membranaktiver Substanzen an der Lecithinmembran 64

3. Diskussion 70
3.1. Auswertung der verschiedenen Meßreihen 70
3.1.1. Serum 70
3.1.1.1. Nativserum 70
3.1.1.2. fraktioniertes Serum 71
3.1.2. physiologische Serumbestandteile 72
3.1.2.1. IgG und Albumin 72
3.1.2.2. Humankomplement 73
3.1.3. in vitro Aktivierung des Komplementsystems 74
3.1.3.1. Trypsin 74
3.1.3.2. Untersuchung einer AGAK-vermittelten in vitro Komplementaktivierung 76
3.1.3.3. Albumininduzierte Komplementaktivierung 81

3.2. Allgemeine Beurteilung, Zusammenfassung 83

4. Anhang, Zusammenstellung der Meßergebnisse 85

5. Literatur 91

1.1. Einleitung

Abgeschlossene Stoffwechselräume sind Voraussetzung für Leben. Morphologisches Korrelat dieses Kompartimentierungsprinzips sind biologische Membranen. Ihre Existenz ist wesentliche Bedingung für eine optimale Organisationsform der Zelle als der kleinsten Einheit höheren Lebens. Viele Stoffwechselfunktionen sind an die Membran gekoppelt.

Bei klinischen Untersuchungen werden funktionelle Veränderungen komplizierter Organisationseinheiten, z.B. eines kompletten Organismus, ganzer Organe, eines Zellsystems unter verschiedenen 'Versuchsbedingungen' untersucht. Oft ergeben sich in solchen Untersuchungen Schwierigkeiten bei der Interpretation der Meßergebnisse, oft gibt es nur einen unklaren Bezug zu entsprechenden klinischen Fragestellungen. Häufig sind in solchen Studien wichtige Parameter experimentell schlecht zugänglich oder überhaupt nicht erfaßbar; das untersuchte Modell stellt ein kompliziertes Meßsystem dar, das nur mit kybernetischen Modellen exakt zu erfassen ist. Selbst einfache experimentelle Modelle wie auch das Versuchssystem, an dem die Messungen dieser Arbeit durchgeführt werden, enthalten noch eine Menge schwer zu kalkulierender Störgrößen.

Gegenstand dieser Untersuchung sind Veränderungen an der Lecithinmembran, die als Folge von Wechselwirkungen membranaktiver Substanzen mit der Lecithinmembran auftreten. In unserem System lassen sich Interaktionen zwischen Membran und Testsubstanzen direkt als Permeabilitätsänderungen messen. Die elektrische Leitfähigkeit der Membran korreliert mit dem Permeabilitätsverhalten. Untersucht werden zunächst physiologische Serumbestandteile. Als klinisch interessante Fragestellung sollen gegen Membranen gerichtete pathologische Serumaktivitäten quantifiziert werden. Das Komplementsystem ist das klassische System, das als humoraler Effektorarm der Immunabwehr im Falle seiner Aktivierung sogenannte lytische Läsionen in der biologischen Membran produziert. Für die klinische Diagnostik wäre es interessant, solche potentiell autoaggressive Serumaktivitäten zu messen. Möglicherweise

könnten sich daraus therapeutische Ansatzpunkte ergeben, pathologische Fehlregulationen könnten verhindert oder günstig beeinflußt werden. Bei entsprechender Zuverlässigkeit des Meßsystems käme eine Anwendung des Verfahrens in der klinischen Routine-Labor-Diagnostik in Betracht.

1.2. Membranen

Grundelement des Lebendigen ist die Zelle, sie ist die kleinste Funktionseinheit der höheren Organismen. Sie wird von einer Membran umgeben, durch die eine räumliche Trennung des intrazellulären Stoffwechsels vom externen Milieu gewährleistet wird. Membranen sind elementare Bestandteile des Lebens, ihre Universalität spricht für eine frühe Entstehung in der Evolution. Morphologie und Funktion der Membran sind eng miteinander gekoppelt. Eine Vielzahl von Stoffwechselaktivitäten, z.B. Reizbildung und -verarbeitung, Stoffaustausch, enzymatische Aktivitäten u.a. sind an die Membran gebunden. (18, 19, 20, 40)

1.2.1. Aufbau biologischer Membranen

Biologische Membranen enthalten Proteine, Kohlenhydrate und Lipide. Der wichtigste Bestandteil sind Lipide (z.B. Phospholipide und Glykolipide). Wesentliches Merkmal ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften ist ihre amphiphile Verhaltensweise. Lipide besitzen einen hydrophilen, wasserlöslichen Kopfteil und einen lipophilen, fettlöslichen Schwanzteil. Folge dieser amphiphilen Struktur ist eine spontane, micellare oder lamellare Anordnung im wässrigen Medium; in einer biologischen Membran sind Lipide doppelschichtig angeordnet ('bilayer'). Immer stellt sich die thermodynamisch günstigste Zustandsform ein. Die hydrophilen Anteile der Lipidmoleküle sind nach außen, die lipophilen Anteile nach innen gerichtet. Die lipophilen Reste der beiden Molekülschichten treten miteinander in Wechselwirkung (Abb. 1.1). Solche doppelschichtige, lamelläre Lipidstrukturen können z.B. aus Phospholipid künstlich hergestellt

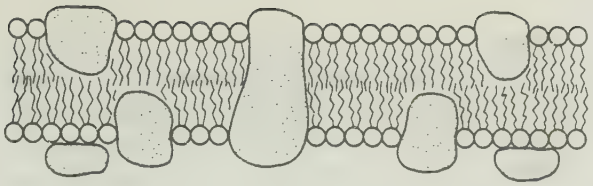


Abb. 1.1 Lipid Bilayer (modifiziert nach 10)

werden. Sie erscheinen in der Aufsicht schwarz und werden deshalb als 'black lipid membrane' (BLM) bezeichnet.

Die ersten detaillierten Vorstellungen über das molekulare Bauprinzip biologischer Membranen stammen von Gorter und Grendel (1925): Sie postulierten einen doppelmolekularen Aufbau der Membran. Dieses bimolekulare, zweischichtige Bauprinzip wurde von Davson und Danielli im Jahr 1935 in ihrem Modell der Elementarmembran dahingehend erweitert, daß die Membranoberfläche neben Lipiden Proteine und / oder Polysaccharide enthält. Die Elementarmembran ist ein sogenanntes 'paucimolekulares Modell', sie ist die Grundlage der heutigen Vorstellungen über Membranen.

Schwierigkeiten in der Untersuchung der Membran ergeben sich daraus, daß ihre Dimension weit jenseits des lichtmikroskopisch Darstellbaren liegt. Gesehen hat man die Membran und ihre Doppelstruktur erstmals in den 60er Jahren, als man mit der Elektronenmikroskopie molekulare Strukturen nach entsprechender Aufbereitung (z.B. Anreicherung mit Osmiumtetroxid oder Gefrierätzung) direkt darstellen konnte. Die hydrophilen Oberflächen der Membran erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild als zwei parallele, dunkle, elektronendichte Linien. Dazwischen befindet sich ein heller Mittelstreifen, der dem lipophilen Membrananteil entspricht. Damit waren die Überlegungen von Gorter / Grendel und Davson / Danielli im Prinzip bestätigt. Auch Röntgenstrukturanalysen stützten später dieses Modell der Elementarmembran.

Das Modell der 'fluid mosaik membrane' berücksichtigt einige weitere Membraneigenschaften. Nach dem Modell der 'Elementarmembran' liegen die Membranproteine den hydrophilen Oberflächen

der Membran auf. Diese Vorstellung wurde im fluid mosaik Modell dahingehend modifiziert, daß zwar manche Proteine durch elektrostatische Kräfte und Wasserstoffbrücken auf der Membranoberfläche fixiert sind, andere Proteine jedoch mit ihren nicht-polaren Anteilen bis in die lipophile Innenschicht der Membran reichen. Außerdem gibt es Proteine, die die ganze Membran durchsetzen. Die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Lipidmolekülen in einer Membran sind durch schwache, nicht-kovalente Bindungen gekennzeichnet (Van-der-Waals'sche Kräfte, Coulomb-Kräfte, Wasserstoff- und Ionenbindungen). In der hydrophil - hydrophob - hydrophilen Schichtung einer Membran kommt es durch eine parallele Ausrichtung der Lipidmoleküle senkrecht zur Membranoberfläche zu hoher Stabilität. Das fluid mosaik Modell berücksichtigt diese Überlegung, indem es anstelle der starren Lipidschicht des Davson - Danielli - Modells einen flüssigen Lipidfilm postuliert, in dem die Lipid - und Proteinmoleküle zweidimensional in der Fläche gegeneinander beweglich sind (Abb. 1.2). (2, 18, 19, 20)

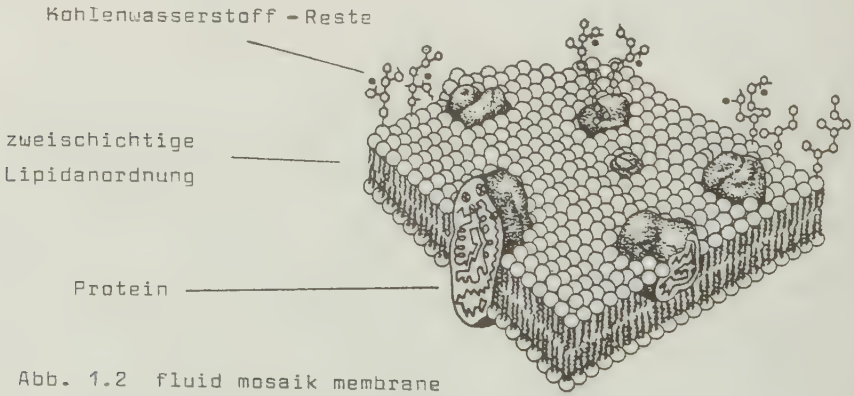


Abb. 1.2 fluid mosaik membrane (modifiziert nach 20)

1.2.2. Lipide

Lipide sind in organischen Lösungsmitteln gut, in Wasser schlecht löslich. In wässrigem Medium bilden sie kolloidale

Lösungen. Chemisch gesehen sind Lipide Ester aus längerkettigen Fettsäuren mit einfachen Alkoholen (einfache Lipide) oder mit mehrwertigen Alkoholen wie Glycerol (komplexe Lipide). Komplexe Lipide sind in der Regel gemischte Di-Phosphorsäure-Ester: Phosphorsäure ist mit Glycerol und einer weiteren alkoholischen Gruppe (Cholin, Ethanolamin, Serin u.a.) verestert.

Sterole gehören nicht zu den Lipiden, sie sind jedoch Bestandteil vieler biologischer Membranen und werden aufgrund ihrer lipidähnlichen Lösungseigenschaften den Lipiden zugerechnet.

In biologischen Membranen kommen in erster Linie Phospholipide (z.B. Lecithin) vor: Sie besitzen ein positiv geladenes quartäres Stickstoffatom und einen negativ geladenen Phosphatrest im Kopfteil (hieraus resultiert eine gute Wasserlöslichkeit). Der lipophile Rest besteht aus zwei in Länge und Sättigungsgrad unterschiedlichen Monocarbonsäuren. (2, 18, 19, 20)

1.2.3. Lipide in wässrigem Medium

Die amphiphilen Eigenschaften der Lipidmoleküle führen in wässrigem Medium zu spontaner Ausbildung ('self assembly') von Molekülaggregaten oder zur Akkumulation der Lipidmoleküle an einer Phasengrenze (hier bildet sich eine flächige Molekülschicht am Phasenübergang). Die hydrophile Gruppe zeigt in Richtung des wässrigen Milieus. Abhängig von der Struktur des hydrophilen Lipidanteils, des lipophilen Lipidanteils (Länge, Sättigungsgrad der Fettsäure-Reste etc.) und den Eigenschaften des Lösungsmittels entstehen unterschiedliche Aggregat-Formen:

Emulsion und Schaum
Micellen
Monolayer (einfache Lipid-Molekül-Schichten
z.B. an der Wasser-Luft-Grenzschicht)
Flüssigkeitskristalle
Phospholipid-Dispersionen in Wasser
Liposomen
Bilayer (18, 19)

1.2.3.1. Micellen

Micellen sind ein Beispiel für einschichtige Lipid-Aggregate: Sphärische oder röhrenförmige Gebilde aus zwei bis 200 Lipidmolekülen im Gleichgewicht mit molekular gelöstem Lipid. Die hydrophilen Gruppen zeigen in Richtung der wässrigen Phase, die Fettsäure-Reste sind in das Innere der Micellen gerichtet und bilden den nicht-polaren Kern. Die spontane Entstehung hängt von verschiedenen Parametern ab, z.B. muß die 'kritische Micellenkonzentration' erreicht werden, damit überhaupt Aggregate entstehen. Unterhalb dieser kritischen Micellenkonzentration liegen die Lipide als Monomere in der Lösung vor. Auch die chemische Struktur der Lipidmoleküle beeinflußt die Bildung von Micellen: Lysolecithine haben eine konische Molekülform und sind deshalb im Vergleich zu Lecithinen, die eine eher zylindrische Form haben, für den Aufbau sphärischer Aggregate besser geeignet als für die Bildung planer Elemente. (18, 19)

1.2.3.2. Bimolekulare, lamellare Lipid-Membranen

'Lamellen' sind in zwei Dimensionen unbegrenzte Molekül-Doppel-Schichten. Sie können z.B. sandwichartig übereinandergepackt sein ('multilayer'), dabei treten sowohl die lipophilen als auch die hydrophilen Anteile zweier benachbarter Lipidschichten miteinander in Wechselwirkung. Diese multilamellare Anordnung der Lipide findet sich z.B. in der Myelinschicht von Nervenfasern.

Auch in Liposomen sind Lipide energetisch günstig angeordnet. Liposomen sind kugelförmige, künstlich erzeugte Lipid-Vesikel mit einem Durchmesser von 20 bis 100 nm (größere Vesikel aus reinem Lipid sind instabil). Sie sind hervorragende Modellsysteme für Membranexperimente.

Ein weiteres, gut zugängliches Membranmodell ist die BLM. Die bimolekulare Schicht einer BLM entsteht, indem man einen dünnen Lipidfilm in wässrigem Medium über ein Loch einer Trennwand zwischen zwei künstlichen Kompartimenten 'spannt' (Abb. 1.3). Unter idealen Versuchsbedingungen erreicht der Lipidfilm eine

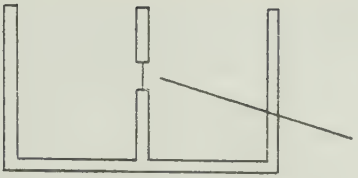


Abb. 1.3 Zweikompartiment-Modell mit Lipidmembran

zweischichtige Konstellation mit einer Dicke von etwa 5 nm. Die Membran erscheint dann im reflektierten Licht optisch schwarz. Aufwendige Untersuchungen haben gezeigt, daß schwarze Lipidmembranen eine bimolekulare, lamellare Struktur haben, ähnlich wie der Bilayer von Liposomen. Der Vorteil des BLM-Systems liegt darin, daß die beiden Kompartimente, die durch die Trennwand voneinander getrennt werden, groß sind. Damit sind sie auch leicht zugänglich für Kontrolle und Veränderung des wässrigen Mediums oder Einführung elektrischer Elektroden. Im BLM-System ist es möglich, das Bilayer-Areal durch Messung seiner elektrischen Eigenschaften präzise zu überwachen und etwaige Veränderungen genau zu bestimmen. Nachteile des Systems liegen in seiner Anfälligkeit gegenüber mechanischen und elektrostatischen Störungen. Außerdem reagiert das System sehr empfindlich auf chemische Verunreinigungen, Detergentien oder organische Lösungsmittel. (18, 19)

1.3. Komplement

Die Immunabwehr läßt sich in spezifische und unspezifische, humorale und zelluläre Elemente untergliedern. Zwischen den verschiedenen Bereichen bestehen enge Verbindungen, z.B. kann eine spezifische humorale Immunreaktion ihre eigentlichen immunologischen Wirkungen über andere, z.B. unspezifische zelluläre Mechanismen entfalten. Das Komplementsystem ist ein unspezifischer, humoraler Verstärkungsmechanismus, der durch AGAK-Komplexe (klassischer Komplementweg) oder unspezifische Faktoren (alternativer Komplementweg) aktiviert werden kann. Komplement ist ein komplexes, aus Glykoproteinen bestehendes Serumproteinsystem, dessen Einzelkomponenten in ähnlicher Weise wie beim Gerinnungssystem ineinandergreifen. Endprodukt

der Komplementkaskade ist ein Komplex, der die Zellmembran angreift (zytotoxischer Komplex, membrane attack complex, MAC). Dies führt zu drastischen Veränderungen des Permeabilitätsverhaltens einer Membran. Sie können z.B. an der BLM direkt gemessen werden. Außer dieser lytischen Aktivität, die der Erregerabwehr dient, besitzt das Komplementsystem noch weitere Funktionen als Mediator bei der Entzündungsvermittlung und Antigenverarbeitung. Mit einer Serumproteinkonzentration von 3 - 3,5 mg/ml macht Komplement etwa 10 % des Serumgesamteiweißes aus.

Die ersten Beobachtungen einer im Serum enthaltenen Substanz, die die AGAK-Reaktion mit einer gegen Bakterien-Zellen gerichteten lytischen Aktivität zu 'komplementieren' vermag, stammen von Fodar (1886, 1887), Nuttal (1888) und Buchner (1889). Buchner nannte diese Substanz 'Alexin'. Pfeiffer und Issaeff lieferten 1894 den anschaulichen Beweis für die Komplementwirkung, indem sie die Lyse von Cholera-Vibrionen im Peritonealraum immunisierter Meerschweinchen zeigten. Die beteiligten Serum-Komponenten sind instabil: Nuttal konnte 1904 nachweisen, daß die bakteriolytische Aktivität des Serums in vitro langsam abnimmt. Außerdem konnte er die Hitzelabilität der betreffenden Komponenten zeigen. Die lytische Aktivität des Serums wird durch dreißigminütiges Erhitzen des Serums auf 56 ^{0} C. vollständig zerstört. Bordet beobachtete 1920, daß hitzeinaktiviertes Antiserum durch Zusatz von nativem Serum seine bakteriolytische Aktivität wiedererlangt. Er schloß daraus, daß mindestens zwei verschiedene Substanzgruppen an der Bakteriolyse beteiligt sein müssen. Die eine Substanz nannte Bordet 'Komplement', sie erwies sich als identisch mit Buchners 'Alexin'. Eine zweite Substanzgruppe bezeichnete Bordet als 'sensibilisierende Substanz' oder 'Ambozeptor'. Dies sind in der heutigen Terminologie spezifische Antikörper, die als Folge der Immunisierung vermehrt produziert werden. Das Zusammenwirken der beiden Substanzgruppen Antikörper und Komplement ist die Grundlage der klassischen, antikörpervermittelten Komplementaktivierung.

Der Nachweis von 9 verschiedenen, am klassischen Komplementweg beteiligten Komponenten des Human-Serums gelang Müller-Eberhardt

im Jahr 1966. Weitere Komponenten (des alternativen Wegs) und eine Reihe von Regulator-Proteinen konnten in der Zwischenzeit identifiziert werden. So besteht das Komplementsystem nach heutiger Kenntnis aus einem komplexen System von etwa 20 verschiedenen Serumproteinen.
(5, 9, 12, 14, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 35, 36 ,37)

1.3.1. Terminologie

Das Komplementsystem führt über zwei verschiedene Aktivierungswege, die in einen gemeinsamen Terminalweg münden, zur Bildung eines lytischen Komplexes (Abb. 1.4).

Die Bestandteile des klassischen und terminalen Komplementwegs werden mit C1, C2, usw. bis C9 bezeichnet. Die Zahlen folgen mit zwei Ausnahmen der Sequenz, in der die Komplement-Komponenten reagieren: a) C1 besteht aus drei Subkomponenten C1q, r und s, die in vivo größtenteils als makromolekularer Komplex im Blut zirkulieren. Die Existenz einer vierten Subkomponente C1z wird diskutiert. b) C4 ist die zweite Komplement-Komponente in der Reaktionssequenz. Die Reaktionssequenz heißt deshalb folgendermaßen: C1 - C4 - C2 - C3 - C5 - C6 - C7 - C8 - C9.

Der alternative Komplementweg wird nach einem der beteiligten Faktoren auch 'Properidinweg' genannt. Seine Bestandteile werden als 'Faktoren' bezeichnet, gefolgt von großen Buchstaben: Faktor B, Faktor D, Faktor P ('P' steht für Properidin), Faktor H (beta 1 H) und Faktor I (C3bINA). H und I sind Regulatorproteine.

Die enzymatische Modifikation bzw. Änderung der biologischen Aktivität wird durch einen Querstrich über der betreffenden Komplement-Komponente angedeutet (z.B. $\overline{C1}$). Geht die Aktivität einer Komponente während der Reaktionssequenz verloren, wird dies durch ein nachgestelltes 'i' anstelle des Balkens angezeigt (z.B. C1i). Die Bezeichnung der Spaltprodukte erfolgt durch nachgestellte Buchstaben 'a' oder 'b'. Entsteht ein größeres und ein kleineres Spaltprodukt, erhält das kleinere den Buchstaben 'a', das größere den Buchstaben 'b'. Inhibitoren sind Stoffe, die eine Komplementkomponente in ihrer Aktivität negativ

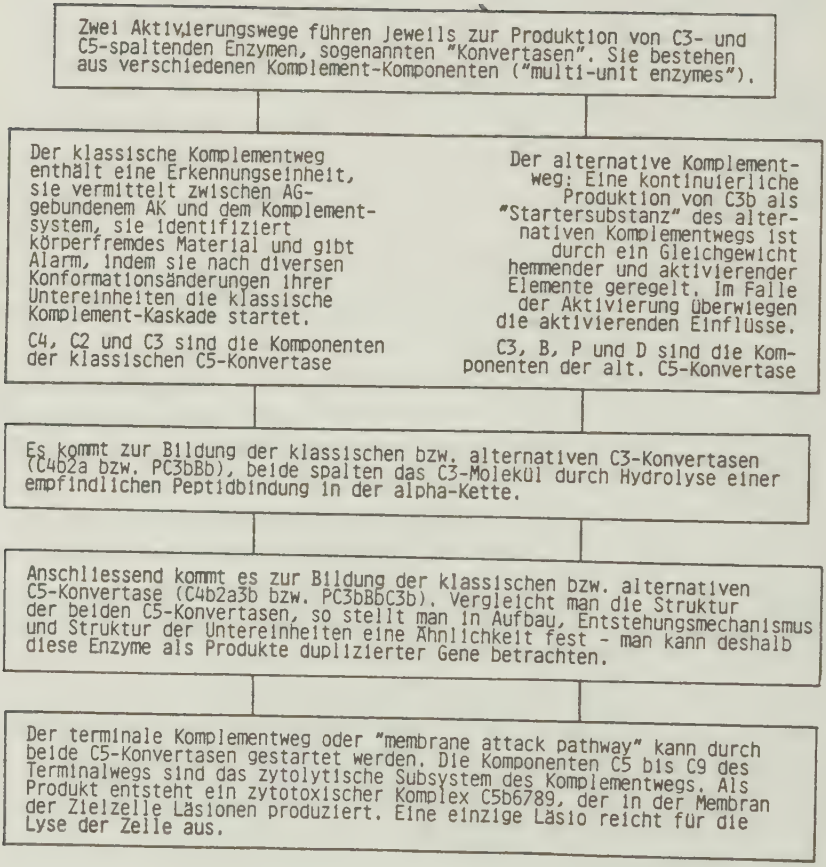


Abb. 1.4 Aufbau des Komplementsystems

beeinflussen (z.B. C1-Inhibitor). Inaktivatoren sind Substanzen, die eine aktivierte Komplementkomponente enzymatisch spalten (z.B. C3b-Inaktivator). (19, 23, 26, 28)

CH_{50}, die Standardeinheit der Komplementaktivität

Die Titration des Komplements erfolgt an einer definierten Menge von Antikörper-beladenen Erys unter standardisierten Bedingungen. Dies führt zu einer sigmoiden Dosis-Antwort-Kurve, die asymptotisch gegen einen Maximalwert (100 % Lyse) strebt. Die der 100 %igen Lyse entsprechende Komplementmenge (MHD, minimum hemolytic dose) läßt sich aufgrund des flachen Kurvenverlaufs nur ungenau bestimmen. Die Bestimmung der 50 % Hämolyse entsprechenden Komplementmenge (CH_{50}) läßt sich aufgrund des in diesem Bereich steileren Kurvenverlaufs besser bestimmen und wird deshalb als Standard-Einheit für die Komplement-Menge genommen. Abb. 1.5 zeigt eine Komplement-Dosis-Antwort-Kurve.

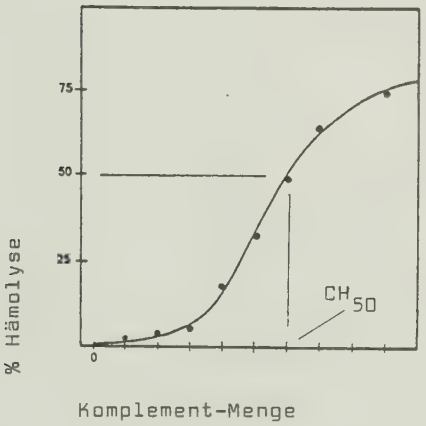


Abb. 1.5 Dosis-Antwort-Kurve bei der Komplement-Titration (nach 5)

Meerschweinchen-Serum enthält 200 - 300 CH_{50}/ml, Human-Serum enthält 40 - 60 CH_{50}/ml. (5)

In Tabelle 1.1 sind einige physikalisch-chemische Eigenschaften einzelner Komplement-Komponenten zusammengefaßt.

Tabelle 1.1 physikalisch-chemische Eigenschaften der einzelnen Komplementkomponenten (modifiziert nach 23, 26)

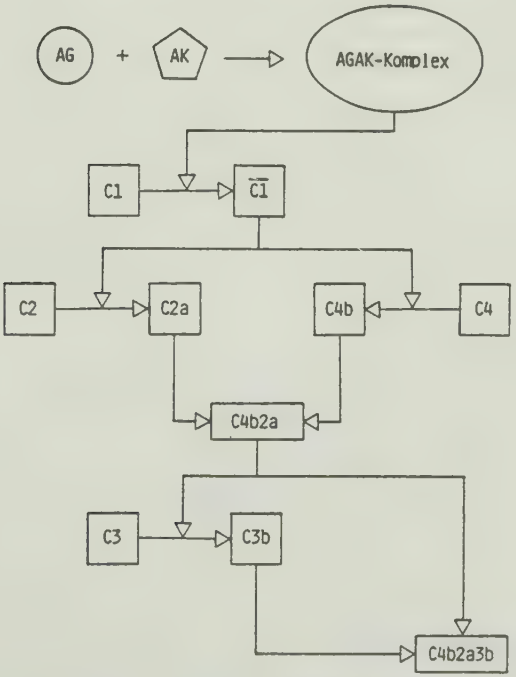
Komponente	elektrophor. Beweglichkeit	Thermo-labilität	Molekular-gewicht	Serumkonzentration /ug/l
C1		+	900.000	300 - 400
C1q	γ_2	+	410.000	190
C1r	β	+	190.000	100
C1s	α_2	-	80.000	120
C2	β_2	+	98.000	30
C2a			72.000	
C2b			32.000	
C3	β_1	-	190.000	1300
C3a			9.000	
C3b			181.000	
C4	β_1	-	204.000	430
C4a			6.000	
C4b			118.000	
C5	β_1	-	206.000	75
C5a			15.000	
C6	β_2	+	128.000	60
C7	β_2	-	121.000	50
C8	γ_1	-	153.000	80
C9	α		78.000	200
B	β_2		100.000	220
Ba			20.000	
D	α		22.000	2
P	γ_2		190.000	25
C1INH	α_2		115.000	180
C3bINA	β		100.000	60
β1H	β		150.000	500
NeF	γ		155.000	

1.3.2.1. Der klassische Komplementweg

Die Bezeichnung 'klassischer Komplementweg' ist historisch bedingt: Der klassische Weg beschreibt die lytische Wirkung von Komplement auf Antikörper-überzogene Erythrozyten. Dies ist das 'klassische' Modell, an dem die Komplementwirkung studiert wurde. Der Begriff 'klassisch' ist in diesem Zusammenhang unglücklich: Der alternative Komplementweg wurde zwar später als der klassische Weg beschrieben, ist aber phylogenetisch älter.

Der klassische Komplementweg ist eine kaskadenförmige Reaktionskette, an deren Anfang die AGAK-Reaktion als zentrales Ereignis und notwendige Voraussetzung der klassischen Komplementaktivierung ablaufen muß. In dieser AGAK-Reaktion ergeben sich

Abb. 1.6 der klassische Komplementweg



klassische C5-Konvertase

sterische Veränderungen am AK-Molekül, erst dann kann es zu einer Aktivierung des klassischen Komplementwegs kommen. In der Folge macht zunächst C1 als Vermittler zwischen AGAK-Komplex und Komplementsystem eine sterische Modifikation durch, anschließend werden C4 und C2 gespalten. Als Produkt erscheint die klassische C3-Konvertase C4b2a, die eine C3-spezifische Hydrolaseaktivität besitzt und durch Anlagerung des C3-Spaltprodukts C3b zur klassischen C5-Konvertase C4b2a3b wird. Die weiteren Reaktionsschritte gehören dem Terminalweg an (Abb. 1.6). (14, 24, 33, 36)

1.3.2.2. Der alternative Komplementweg

Der alternative Komplementweg produziert eine dem klassischen Weg in ihrer Funktion analoge C5-Konvertase C3bBbPC3b unter Umgehung der frühen Komplementfaktoren C1, C2 und C4. Die Aktivierung des alternativen Wegs erfolgt dabei nicht durch eine spezifische Immunreaktion infolge der Bildung von AGAK-Komplexen, sondern als direkte Konsequenz einer Veränderung im Regulationssystem des C3-Metabolismus. Die Bedeutung des alternativen Wegs der Komplementaktivierung für den Organismus liegt darin, daß auf diese Weise auch in den Phasen, wo noch keine spezifischen Antikörper vorhanden sind und damit eine Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg noch nicht möglich ist, die biologischen Leistungen des Komplementsystems genutzt werden können.

Die Entstehung des aktivierten C3b-Fragments aus C3 steht am Anfang der Aktivierung des alternativen Komplementwegs. Vom Ausmaß der C3b-Produktion hängt ab, ob eine effektive Aktivierung des alternativen Wegs erfolgt oder nicht. Unter physiologischen Voraussetzungen läuft ständig eine geringgradige Produktion von C3b durch 'low grade enzymes' ab, die aber nur zu einem sehr niedrigen, zur effektiven Aktivierung nicht ausreichenden C3b-Spiegel führt, da das C3b-Fragment ebenso konstant, wie es produziert wird, durch Kontrollenzyme abgebaut wird. Eine Konzentrationserhöhung dieses 'initialen' C3b ist notwendige Voraussetzung für das Zustandekommen einer effektiven Aktivierung.

Sie tritt ein, wenn C3b nicht mehr von Kontrollsystemen inaktiviert werden kann und damit der C3b-Spiegel ansteigt. Solche Bedingungen bestehen z.B. in der lokalen Mikroumgebung von Stoffen wie Zymosan oder auf der Oberfläche von Mikroben. Offensichtlich sind hier die Kontrollenzyme in ihrer Aktivität außer Kraft gesetzt. Als Folge kommt es durch Reaktion der Faktoren B, D und P zur Ausbildung eines hochaktiven C3-spaltenden Enzymkomplexes C3bBbP und schließlich nach Anlagerung eines weiteren C3b-Moleküls zur Bildung der alternativen C5-Konvertase C3bBbPC3b. Der alternative Komplementweg ist ein durch verschiedene Faktoren geregelter Rückkopplungskreis ('feedback circle'), der nach Überschreiten einer

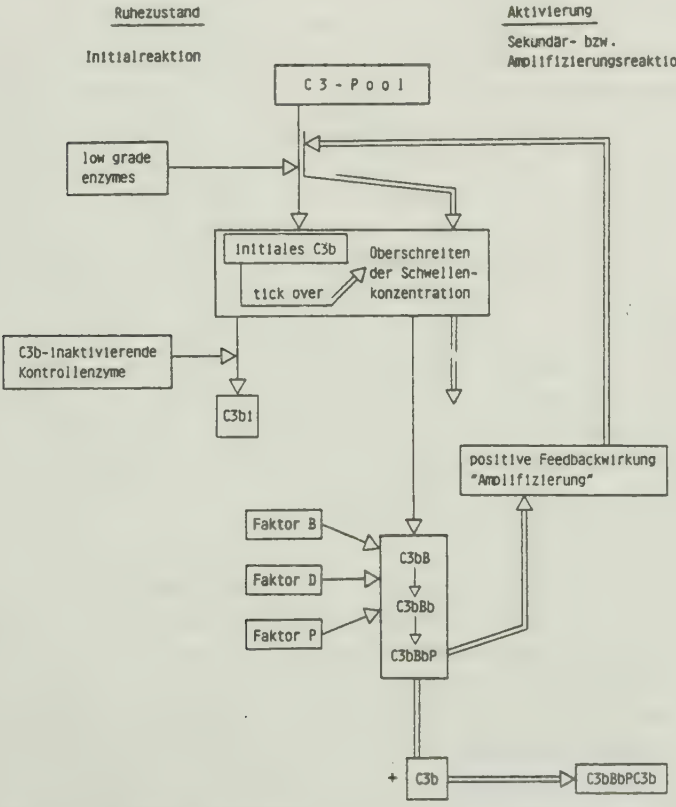


Abb. 1.7 der alternative Komplementweg

alternative C5-Konvertase

C3b-Schwellenwertkonzentration schlagartig anläuft ('tick-over'). Weitere Induktoren für den alternativen Weg sind antigengebundene Immunglobuline der Klassen IgE und IgA, Polyanionen, Inulin, Lipopolysccharide u.a. Diese Stoffe führen alle zu einer Situation, in der der inaktivierende Einfluß der Kontrollproteine blockiert wird. Abb. 1.7 zeigt eine schematisierte Darstellung des alternativen Komplementwegs. (5, 9, 14, 24, 36, 37)

1.3.2.3. Der terminale Komplementweg und Komplement-Membran-Wechselwirkungen

Die terminalen Komplement-Komponenten C5b bis C9 greifen die Membran an. Sie stellen das zytotoxische Subsystem des Komplementsystems dar. Der Mechanismus der Membranlyse wurde an verschiedenen Modellsystemen untersucht: AK-überzogene Erythrozyten werden durch Komplement lysiert. Durch die Wirkung von Komplement werden markierte Stoffe aus dem Inneren von Liposomen freigesetzt. Auch schwarze Lipidmembranen werden durch Einwirkung von Komplement zerstört. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß Komplement direkt an der Lipidschicht der Membran angreift. Zur Erklärung des Phänomens gab es unterschiedliche Ansatzpunkte: a) Komplement zerstört Membranen auf enzymatischem Wege (z.B. Hydrolyse der Phospholipide); b) Komplement produziert im Laufe seiner Reaktionskaskade eine detergentienähnliche Substanz und c) Komplement führt zur Bildung eines Membrankanals, indem sich ein zytotoxischer Komplementkomplex mit Hilfe seiner hydrophoben Anteile in den Lipid Bilayer einsenkt ('doughnut hypothesis').

Die beiden ersten Hypothesen wurden experimentell widerlegt. Die letzte Hypothese konnte durch verschiedene experimentelle Ansätze gestützt werden. Es scheint berechtigt, die Existenz eines Membrankanals als Produkt des terminalen Komplementwegs anzunehmen: Eine ringförmige, elektronenmikroskopisch sichtbare Struktur, aufgebaut aus den Komplement-Komponenten C5b - 9 (membrane attack complex) penetriert den Lipid Bilayer und bildet einen stabilen transmembranären Kanal, dessen Achse

senkrecht zur Membranebene steht. Funktionell resultieren 'lytische Membranläsionen'; die Kompartimentierungsfunktion der Membran ist durchbrochen, eine ungehinderte Passage niedermolekularer Substanzen (Salze, Wasser) durch diese Membrankanäle wird dadurch möglich, die Lyse ist eingeleitet. Für die Lyse eines Erythrozyten reicht bereits eine einzige Läsion in der Zelle aus ('one hit theory'). Abb. 1.8 zeigt in einer vereinfachten Darstellung die Reaktionssequenz des Terminalwegs. (4, 8, 9, 16, 25, 28, 29, 30)

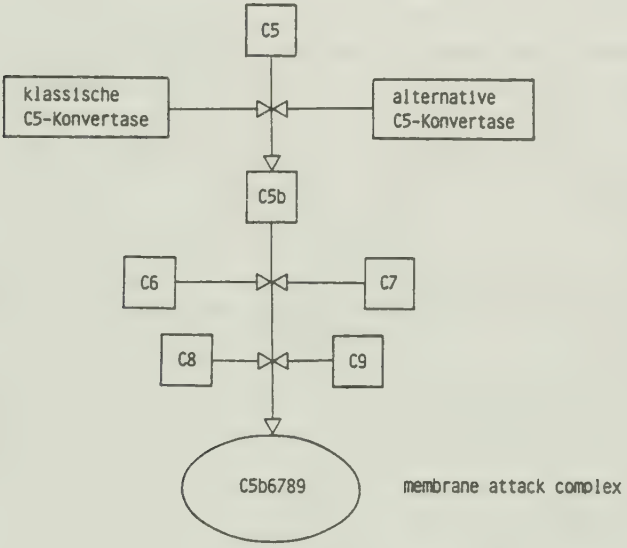


Abb. 1.8 der terminale Komplementweg

1.3.3. Reaktionsschritte des klassischen Wegs

1.3.3.1. Die AGAK-Reaktion

In vivo steht die AGAK-Reaktion am Beginn des klassischen Komplementwegs. Es kommt zur Reaktion zwischen der antigenen Determinanten und der homologen Struktur des Antikörpers. Antigene sind Substanzen mit einem Molekulargewicht von mehr

als 10.000, also hochmolekulare Stoffe wie Proteine, Polysaccharide (z.B. bakterielles Endotoxin) oder Teile höherorganisierter Strukturen (z.B. Mikroorganismen, körperfremde Zellen). Auch niedermolekulare Stoffe (z.B. manche Hormone, Arzneimittel), die an sich nicht zur Produktion von spezifischen Antikörpern führen, können nach Kopplung an hochmolekulare Trägerstoffe (z.B. Albumin) antigenen Charakter annehmen. Sie werden Haptene genannt. Antikörper sind körpereigene, von B-Lymphozyten synthetisierte Immunglobuline. Sie sind Teil des humoralen Abwehrsystems. Stimulus der Antikörpersynthese sind Antigene. Jede antigene Determinante eines Antigens (ein Antigen kann u.U. über mehrere antigene Determinanten verfügen) induziert die Bildung eines entsprechenden, spezifischen Antikörpers.

Die Gruppe der Immunglobuline ist bezüglich Struktur und Funktion sehr heterogen. Die Einteilung der Immunglobuline erfolgt in fünf Klassen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Die Grundeinheit aller Immunglobuline (Abb. 1.9) besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten ('heavy' bzw. 'light' chains). IgG, IgE und IgD sind monomere Immunglobuline, sie bestehen aus einer Grundeinheit. IgM besteht aus fünf Grundeinheiten, IgA aus zwei. Durch enzymatische Spaltung erhält man verschiedene Fragmente: Die Spaltung durch Papain erzeugt Fab- und Fc-Fragmente. Im Fab-Fragment ('ab'

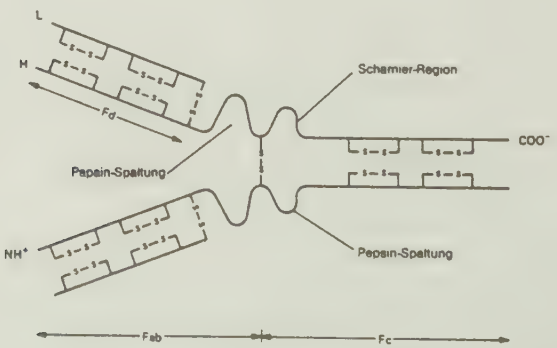


Abb. 1.9 Diagramm eines IgG-Moleküls (modifiziert nach 15)

steht für antibody) befindet sich die antigenbindende Struktur, das Fc-Fragment enthält eine Rezeptorstruktur, die die Komplementaktivierung vermittelt. Diesen sog. C1q-Rezeptor (C1q ist das erste Glied des klassischen Komplementwegs) gibt es nur in IgM und einigen IgG-Subtypen, deshalb können nur diese Immunglobuline den klassischen Komplementweg in Gang setzen. (5, 9, 23, 26, 29, 33, 37)

1.3.3.2. Konfigurationsänderung des AK und C1q-Aktivierung

C1q ist die Erkennungseinheit bei der klassischen Komplementaktivierung. Es besteht aus sechs globulären Untereinheiten, die durch sechs 'Stiele' miteinander zu einem Bündel verbunden sind. Die AK-bindenden Strukturen sind in den globulären Untereinheiten lokalisiert.

Der C1q-Rezeptor der komplementbindenden AK (IgG und IgM) wird nach Reaktion mit dem entsprechenden AG durch eine Konfigurationsänderung des Fc-Anteils im AK offengelegt. In vitro kann diese Konfigurationsänderung des Fc-Fragments durch chemische oder thermische Aggregation der Immunglobuline induziert werden. Zur Komplementaktivierung (in vivo) muß also eine AGAK-Reatkion abgelaufen sein. Außderdem müssen mindestens zwei Fc-Fragmente mit offengelegten C1q-Rezeptoren in unmittelbarer Nachbarschaft vorhanden sein, damit eine Aktivierung der C1q-Komponente eintritt. Diese Voraussetzung ist für das pentamere IgM automatisch erfüllt, von dem monomeren IgG sind mindestens zwei benachbarte Moleküle zur Komplementaktivierung erforderlich. Eine weitere Möglichkeit der C1q-Aktivierung besteht in der Reaktion mit Komplexen von CRP. So läuft das Komplementsystem auch an, wenn Akutphasenmoleküle synthetisiert werden. Sofern die entsprechenden Bindungsstellen im C1q-Molekül besetzt werden, entsteht die aktivierte Form C1q'. (5, 9, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 33)

1.3.3.3. C1-Aktivierung

C1 ist ein Makromolekül, es besteht aus drei Subkomponenten C1q, C1r und C1s. Sie werden durch Calcium-Ionen zusammengehalten. Die

Aktivierung erfolgt successive über Konfigurationsänderungen der einzelnen Subkomponenten (Spaltung von Disulfidbrücken): C1q wird durch Wechselwirkung mit entsprechenden Fc-AK-Rezeptoren zum aktivierten C1q'. C1q' aktiviert C1r zu C1r', schließlich bewirkt C1r' die C1s-Aktivierung zu C1s'. C1r' und C1s' sind unterschiedlich spezifische Esterasen. Nur C1s' ist im Sinne der Weiteraktivierung der Komplementkaskade die lytisch wirksame Esterase. Am Ende der C1-Aktivierung entsteht ein hochwirksamer, membrangebundener Enzymkomplex $\overline{C1}$ mit C2- und C4-Spezifität. (5, 23, 26, 28, 29, 33, 37)

1.3.3.4. C4-Aktivierung

Zunächst wird C4 an den AGAKC1-Komplex unter Bildung eines intermediären AGAKC1C4-Komplexes angelagert. Im weiteren wird C4 durch das enzymatisch aktive $\overline{C1}$ in zwei Fragmente C4a und C4b gespalten. C4a hat nach bisheriger Kenntnis keine Bedeutung, C4b ist Bestandteil der Komplement-Kaskade. C4b besitzt eine kurzzeitig aktivierte Membranbindungsstelle. In der Nachbarschaft jedes $\overline{C1}$ kommt es zur kovalenten Bindung von C4b-Molekülen an die Membran, wobei aufgrund der nur kurzzeitig aktiven Membranbindungsstelle nur ein Teil der entstehenden C4b-Moleküle auf der Membranoberfläche gebunden werden. Die Existenz von C4b-Membran-Rezeptoren wird diskutiert. Die nicht gebundenen C4b-Moleküle verbleiben als inaktive C4bi-Fragmente in der flüssigen Phase. Außer der Membranbindungsstelle besitzt C4b noch eine weitere Bindungsstelle für C2. Diese ist im Gegensatz zur Membranbindungsstelle sehr stabil. (5, 23, 25, 27, 28, 32)

1.3.3.5. C2-Aktivierung, Bildung der klassischen C3-Konvertase

Der erste Schritt der C2-Aktivierung besteht in einer magnesiumabhängigen Anlagerung des C2 an membrangebundenes C4b. Anschließend wird die C2-Komponente durch benachbartes $\overline{C1}$ in die Fragmente C2a und C2b gespalten. Das kleinere Spaltprodukt C2a wird unter Mithilfe von Magnesiumionen fest, aber nicht irreversibel an C4b gebunden. Es entsteht ein Komplex C4b2a, die klassische

C3-Konvertase (natürliches Substrat ist C3). C2a enthält die enzymatisch aktive Struktur. Die klassische C3-Konvertase funktioniert C1-unabhängig. Für die C3-Spaltung und alle weiteren Reaktionsschritte wird kein aktiviertes $\overline{C1}$ mehr benötigt. Ein einziger C4b2a-Komplex kann mehrere hundert C3 umsetzen (Amplifizierungsreaktion). Die Limitierung des Substratumsatzes ist durch verschiedene Kontrollsysteme geregelt, z.B. auch durch die relative Instabilität des C4b2a-Komplexes: Die enzymatisch aktive Stelle des C2a ist nur für kurze Zeit bindungsfähig für C3-Moleküle. Die Halbwertszeit beträgt bei 32 °C. 12 min. Anschließend verliert C2a seine Enzymaktivität und wird in die wässrige Phase freigesetzt. (5, 23, 26, 28, 29, 33, 37)

1.3.3.6. C3-Aktivierung, Bildung der klassischen C5-Konvertase

Die C3-Komponente ist die im Serum in größter Menge vorhandene Komplement-Komponente. Sie stellt ein Glied der klassischen Komplement-Kaskade dar. Außerdem ist das C3-Spaltprodukt die Startersubstanz des alternativen Komplementwegs (siehe dort).

C3 wird in vivo durch die klassische bzw. alternative C3-Konvertase aktiviert. In vitro gibt es außerdem noch eine Reihe anderer C3-aktivierender Substanzen: z.B. einfache, unspezifische Serin-Histidin-Esterasen wie Plasmin, Trypsin, Thrombin, Elastase. Diese Enzyme sind im Serum durch Proteinase-Inhibitoren gehemmt. Als 'C1-Bypass' bezeichnet man die direkte C3-Aktivierung durch hohe C1-Konzentrationen. Aktivierung der C3-Komponente bedeutet Spaltung des Moleküls in ein kleineres Fragment C3a, das die Eigenschaften eines Entzündungsmediators besitzt, und ein größeres Fragment C3b. Naszentes C3b entwickelt eine kurzzeitig aktivierte, hydrophobe Bindungsstelle unmittelbar nach der Spaltung, die eine kovalente Bindung an verschiedenen Oberflächenstrukturen ermöglicht. Beispielsweise kann das C3b-Molekül auch an speziellen, dafür vorgesehenen Rezeptoren auf der Zellmembran gebunden werden. Nicht an die Membran gebundene C3b-Moleküle verlieren ihre Bindungsfähigkeit und verbleiben als inaktive Fragmente C3bi in der flüssigen Phase. Membrangebundenes C3b bildet zusammen mit der klassischen C3-Konvertase C4b2a einen neuen Intermediärkomplex

C4b2a3b, die C5-Konvertase. C3b und C4b enthalten die Bindungsstelle für das Substrat C5. C2a ist die katalytisch wirksame Untereinheit.

C3b hat neben seiner Funktion als Komponente eines wichtigen Komplement-Intermediärkomplexes noch weitere Eigenschaften (Tab 1.2): Immunadhärenz und Opsonisierung. Neben der C3b-Membran-Bindungsstelle kann C3b über eine weitere, schwache Bindungsstelle mit homologen Rezeptoren auf Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, B-Lymphozyten. Erythrozyten und Thrombozyten reagieren. Hier zeigt sich eine analoge Funktion zum Antikörper: Fremdstoffe beladen sich mit C3b-Molekülen, es kommt jedoch nicht wie bei der AGAK-Reaktion zu einer spezifischen 'Schlüssel-Schloß-Reaktion' sondern lediglich zu einer unspezifischen 'Markierung' des Fremdmaterials. C3b lagert sich als Opsonin an Antigene an und ermöglicht dadurch deren Phagozytose (Opsonisierung). Zusätzlich wird die Phagozytosebereitschaft der Makrophagen durch die C3b-Markierung der Fremdsubstanz positiv beeinflußt, C3b-markierte Fremdkörper locken Leukozyten und andere Zellen mit entsprechenden Rezeptoren an (Immunadhärenz). Damit ist C3b ein Mediator der unspezifischen, zellulären Immunabwehr, indem es die Verarbeitung des antigenen Materials induziert.
(1, 5, 9, 11, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 33, 35, 37)

Tabelle 1.2 C3b-Wirkungen

Zytolyse	membrangebundenes C3b reagiert mit den Komponenten des Terminalwegs
Opsonisierung	WW zwischen gebundenem C3b und zellulären Elementen der Immunabwehr
Immunadhärenz	Antigenverarbeitung: C3b triggert die Phagozytosebereitschaft der Granulozyten

1.3.3.7. Schema

Abbildung 1.10 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Reaktionsschritte des klassischen Komplementwegs.

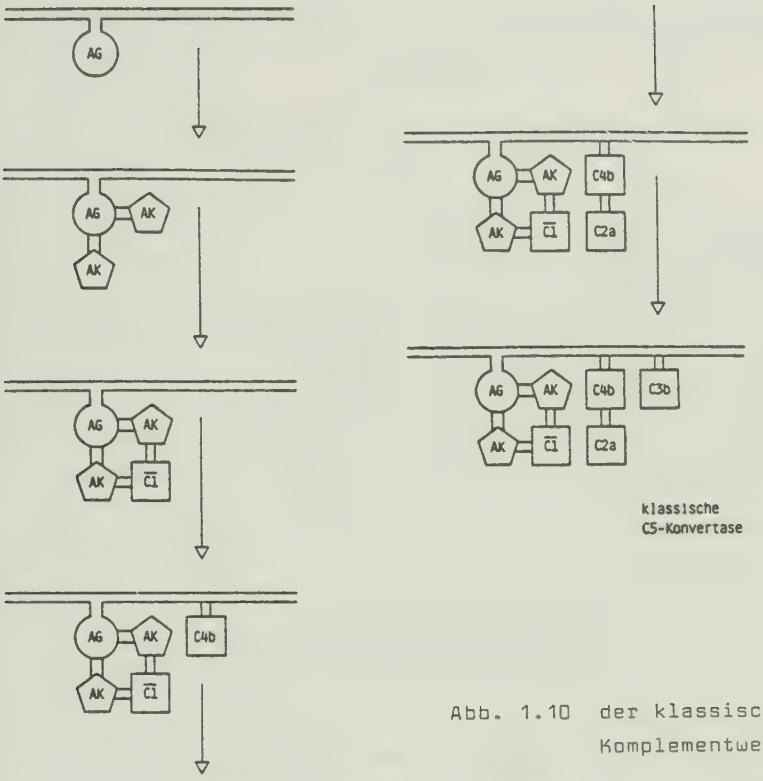


Abb. 1.10 der klassische Komplementweg

1.3.3.8. Kontrolle des klassischen Komplementwegs

Der klassische Weg unterliegt der Regulation durch verschiedene Mechanismen: Eine wirksame Regulation des Systems ergibt sich bereits aus der Instabilität bestimmter Intermediärkomplexe. Darüberhinaus gibt es eine Reihe von Inaktivatoren, die auf verschiedenen Stufen der Komplement-Kaskade regulierend eingreifen: C1q-Inhibitor (C1q-INH), C1-Esterase-Inaktivator (C1-INA), zwei Regulator-Proteine, die den C3b-Metabolismus katalysieren (C3b-Inaktivator C3b-INA und das beta-1H-Protein, siehe auch unter 'alternativer Komplementweg') und weitere Carboxypeptidasen, die als Anaphylatoxin-Inaktivatoren fungieren. Auch für C4b gibt es einen Inaktivierungsmechanismus: Eine C4-spezifische Plasmaprotease

(C4b-INA, C4b-Inaktivator) bewirkt zusammen mit einem Cofaktor die C4b-Inaktivierung. (31, 33, 37)

1.3.4. Reaktionsschritte des alternativen Komplementwegs

Während beim klassischen Komplementweg eine spezifische AGAK-Reaktion ablaufen muß und die damit verbundene initiale Aktivierung von C1q einen kaskadenförmigen Ablauf der Aktivierungsschritte im klassischen Komplementweg zur Folge hat, gibt es im alternativen Komplementweg keine solche spezifische Startreaktion. Die Aktivierung des alternativen Wegs erfolgt unspezifisch. Der alternative Komplementweg ist ein Regelkreis, in dem C3 ständig in geringem Ausmaß zu C3b, dem Initialfaktor des alternativen Wegs umgesetzt wird (Initialreaktion). Im Aktivierungszustand des Systems entsteht ein hochaktives C3-spaltendes System das über eine positive feed-back-Wirkung den Regelkreis dahingehend beeinflußt, daß das Endprodukt, die alternative C5-Konvertase (C3bBbPC3b) in einer höheren, wirksamen Konzentration gebildet wird (Sekundärreaktion). So kann man den alternativen Weg auch als Amplifizierungsreaktion bezeichnen. (23, 29, 33, 37)

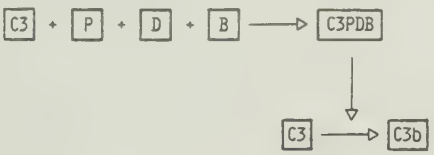
1.3.4.1. Initialreaktion des alternativen Komplementwegs

Im Ruhezustand erfolgt eine ständige, jedoch nicht effektive Aktivierung des alternativen Komplementwegs durch eine langsame, konstante Spaltung von C3 im Blut durch 'low grade enzymes'. Der C3b-Spiegel und damit das Ausmaß der Aktivierung des alternativen Wegs werden durch einen Kontrollmechanismus auf einem geringen Niveau gehalten. Naszentes C3b führt an sich noch nicht zur Aktivierung des Systems (es müssen zusätzlich Aktivatoren von außen mitwirken, damit der C3-Spiegel die Schwellenkonzentration überschreitet und eine Aktivierung des Systems eintritt).

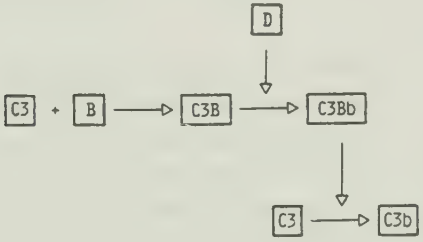
Die Struktur des 'low grade enzymes' wird in der Literatur unterschiedlich angegeben, es werden zwei verschiedene Komplexe diskutiert:

A. Zusammenlagerung von C3, P, D und B in einer magnesium-

abhängigen Reaktion zu einem Komplex C3PD, der aufgrund einer geringen, spezifischen C3-spaltenden Enzymaktivität zur Produktion eines niedrigen, initialen C3-Spiegels führt.



B. Durch magnesiumabhängige Anlagerung von Faktor B an C3 entsteht ein Komplex C3B. Hierdurch erfährt Faktor B eine Substratmodulation und wird somit angreifbar für Faktor D. Faktor D spaltet aus B ein Fragment Ba ab, es entsteht ein neuer Komplex C3bBb mit geringer C3-spaltender Aktivität.



Beide Enzymkomplexe führen zur Produktion von C3b, das sich (wie bei der klassischen Komplementaktivierung) aufgrund einer kurzzeitig aktivierten Bindungsstelle kovalent an der Membranoberfläche binden kann. In diesem membrangebundenen Zustand kann C3b bei entsprechender Konzentration die Aktivierung des alternativen Wegs einleiten. (5, 9, 24, 26, 33, 37)

1.3.4.2. Aktivierung des alternativen Komplementwegs

Voraussetzung für die Aktivierung des alternativen Wegs ist das Anlaufen der Sekundärreaktion: Die initiale C3b-Konzentration muß über eine Schwellenwertkonzentration ansteigen. Eine Aus-

schaltung oder Umgehung der C3b-inaktivierenden Kontrollenzyme führt zu einem relativen C3b-Konzentrationsanstieg infolge des verzögerten C3b-Abbaus. Ein absoluter Anstieg der C3b-Konzentration kommt durch zusätzliche C3b-produzierende Agentien zustande.

Mechanismen, die den C3b-Abbau verzögern (relative C3b-Erhöhung)

Fällt der Kontrollmechanismus, der den C3b-Abbau katalysiert, aus, so findet kein C3b-Metabolismus mehr statt, deshalb steigt der C3b-Spiegel an. Oberflächen, welche die Aktivierung des alternativen Komplementwegs bewirken (bestimmte Mikroorganismen, mikrobielle Polysaccharide u.a.) schützen gebundenes C3b vor dem Zugriff durch Kontrollenzyme.

Mechanismen, die zu einer absoluten Erhöhung des C3b-Spiegels führen

Neben der physiologischen, ständigen C3-Spaltung durch Enzyme der Initialreaktion besitzen noch weitere Enzyme die Fähigkeit, C3 zu spalten: Serin-Histidin-Esterasen aus phagozytischen Zellen (Elastase, Kathepsin), bakterielle Proteasen, Plasmin, Thrombin, Trypsin. Diese Enzyme sind in vivo durch im Serum vorhandene Proteinase-Inhibitoren gehemmt. Das entsprechende C3-spaltende Enzym des alternativen Wegs (Faktor D) ist resistent gegen alle im Serum vorkommenden Proteinase-Inhibitoren. Als weiteres Reagenz zur Aktivierung des alternativen Komplementwegs kommt 'cobra venom factor' in Betracht. Es handelt sich um ein C3b-Analogon, das jedoch im Gegensatz zum Human-C3b resistent gegen die im menschlichen Serum vorhandenen C3b-inaktivierenden Kontrollenzyme ist. Auch die klassische C3-Konvertase C4b2a hat die Fähigkeit, C3b zu produzieren. Eine Aktivierung des alternativen Wegs kann somit auch über die Aktivierung des klassischen Wegs erfolgen: Sind komplementbindende Antikörper vorhanden, wird naszierendes C3b als initiierender Faktor des alternativen Wegs von der klassischen C3-Konvertase zur Verfügung gestellt. Beispielsweise können in den Körper eindringende Mikroorganismen mit Spuren von komplementbindenden Antikörpern reagieren und damit über

den klassischen Weg eine kleine Menge C3b produzieren. Über die autokatalytischen Eigenschaften des alternativen Wegs kann dann die C3b-Produktion zusätzlich beschleunigt werden. (9, 23, 26, 33, 37)

1.3.4.3. Sekundärreaktion, Leistungsphase

Die Sekundärreaktion produziert ein C3-spaltendes Enzym, das im Unterschied zu den C3-spaltenden Enzymen der Initialreaktion eine wesentlich höhere Aktivität zeigt.

Anlagerung von Faktor B an C3b

In einer magnesiumabhängigen Reaktion lagert sich Faktor B an membrangebundenes C3b an, es entsteht ein membrangebundener Komplex C3bB mit schwacher C3-spaltender Aktivität.

Faktor B - Aktivierung durch Faktor D

Faktor B erfährt durch C3b eine Modulation, wodurch B Substrateigenschaften für D erwirbt. Faktor D ist eine Proteinase-Inhibitor-resistente Serin-Histidin-Esterase mit Faktor B - Spezifität und liegt als aktives Enzym im Serum vor. Faktor D aktiviert C3-gebundenes B, indem es in einer magnesiumabhängigen Reaktion ein Fragment Ba abspaltet. Das größere Fragment Bb bleibt mit C3b assoziiert. Der Komplex C3bBb ist ein wirksames C3-spaltendes Enzym, es ist jedoch nur wenig stabil, da es sehr schnell in seine Bestandteile C3b und Bb dissoziiert (die HWZ beträgt bei 37°C. 5 min.). Diese Dissoziation wird durch beta-1H, ein Regulator-Protein (s.u.) noch beschleunigt. Die C3-spaltende Aktivität ist auf dem Bb-Fragment lokalisiert.

Stabilisierung des C3bBb-Komplexes durch Faktor P

Durch Einbau von Faktor P in den Komplex C3bBb entsteht der trimolekulare Komplex C3bBbP. Faktor P stabilisiert den Komplex über eine spezielle, dafür vorgesehene Bindungsstelle an C3b.

Voraussetzung für die Stabilisierung durch P ist, daß Properdin vorher eine nicht-proteolytische Konformationsänderung erfährt. Sie ergibt sich möglicherweise durch WW mit dem Enzym selbst. Durch die Stabilisierung wird die Tendenz zur Dissoziation vermindert. C3bBbP ist ein hocheffizientes C3-spaltendes Enzym, das - wenn es einmal entstanden ist - immer mehr C3b-Moleküle produziert. Als Folge der positiven feed-back-Wirkung entstehen immer neue C3bBbP-Komplexe. Dies entspricht einem autokatalytischen Prozeß, der nur genügend C3b braucht, um anzulaufen (tick-over).

Die alternative C5-Konvertase

Durch weitere Anlagerung eines C3b-Moleküls an den C3-spaltenden Komplex C3bBbP entsteht die alternative C5-Konvertase C3bBbPC3b. Bb enthält die katalytisch aktive Struktur, P dient der Stabilisierung des Moleküls. (9, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 37)

1.3.4.4. Schema

Abb. 1.11 zeigt eine vereinfachte Darstellung der Reaktionsschritte des alternativen Wegs.

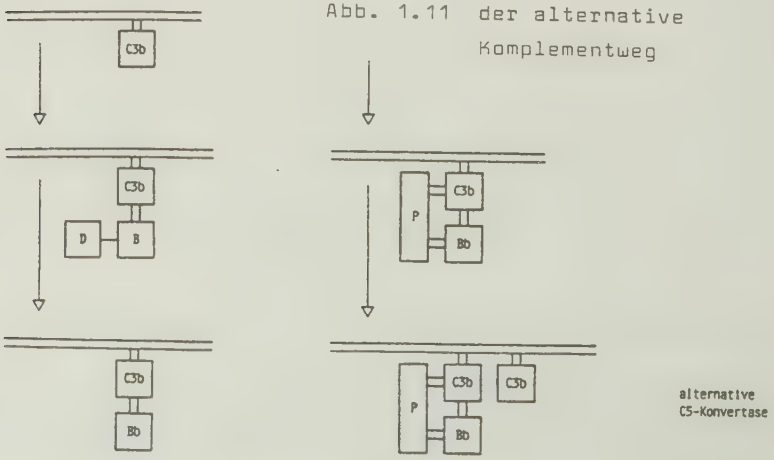


Abb. 1.11 der alternative Komplementweg

1.3.4.5. Stabilisierung der alternativen C3-Konvertase durch NeF (nephritic factor)

NeF ist ein pathologischer Serumbestandteil, der immunglobulinähnliche Eigenschaften besitzt. Er verhält sich wie ein gegen C3b8b gerichteter Autoantikörper, der sich an Intermediärprodukte des alternativen Wegs bindet. Die Intermediärprodukte C3b8 und C3b8b werden stabilisiert und vor dem Zugriff durch die Kontrollproteine beta-1H und C3b-INA geschützt. Dies führt zu einem Anlaufen der Sekundärreaktion des alternativen Wegs und damit zu einer effektiven Aktivierung des Systems. (23, 24, 38)

1.3.4.6. Kontrolle des alternativen Wegs

Analog zur Regulation des klassischen Wegs unterliegt auch der alternative Komplementwegs verschiedenen regulatorischen Mechanismen. Ein Regulans ist auch hier die definierte, zeitlich begrenzte Stabilität der verschiedenen Intermediärprodukte. Hinzu kommen die C3b-metabolischen Funktionen der beiden Kontrollproteine C3b-INA (= KAF) und beta-1H. Erniedrigte Konzentrationen der Kontrollproteine führen zu einer spontanen Aktivierung des Systems, erhöhte Spiegel bedingen eine erhebliche Beeinträchtigung des alternativen Wegs. Beta-1H schleust C3b in die Inaktivierung ein, indem es mit Faktor B um diesselbe Bindungsstelle am C3b-Molekül konkurriert. Die Dissoziation des C3b8b-Komplexes wird so durch beta-1H beschleunigt. Bb wird aus dem Komplex verdrängt und erscheint als inaktives Bbi in der Lösung. Es entsteht ein enzymatisch inaktiver Komplex C3b-beta 1H, der infolge Substratmodulation durch beta-1H angreifbar wird für C3b-INA, ein proteinaseinhibitor-resistentes Enzym, das in vollaktiver Form im Blut zirkuliert. Durch C3b-INA kommt es zu einer enzymatischen Spaltung und damit endgültigen Inaktivierung von C3b. Als Endprodukt erscheint das inaktive Fragment C3bi (Abb. 1.12).

Die Wirkung der Induktoren des alternativen Wegs besteht in einer Blockade der Inhibitor-Wirkung. Oberflächen, die die Aktivierung des alternativen Wegs erlauben, binden C3b und

schützen dieses C3b vor dem Einfluß der Kontrollproteine. Dies führt zu einem maximalen C3b-Umsatz und damit zu einer effektiven Aktivierung des Systems. (22, 23, 24, 26, 29, 31, 33, 37)

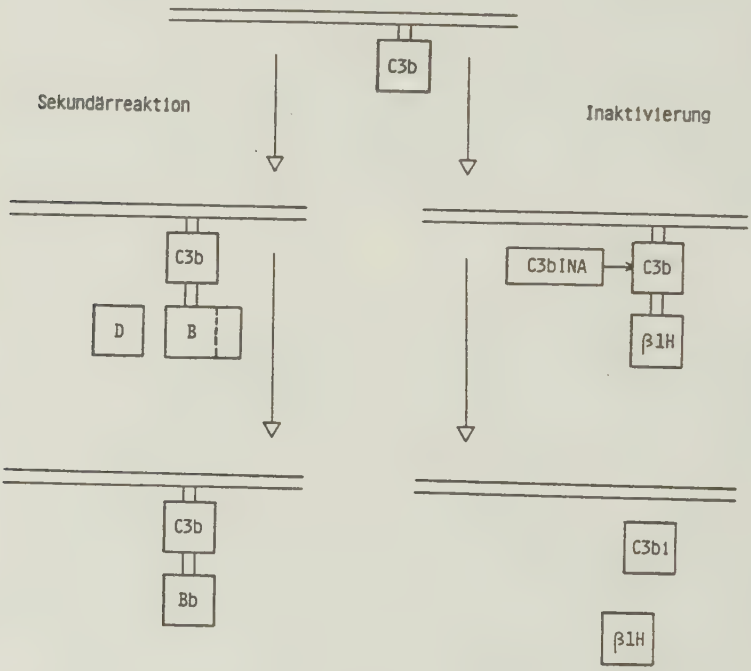


Abb. 1.12 Kontrolle des alterntiven Komplementwegs

1.3.4.7. Aktivität der Spaltprodukte C3a und C5a

C3a und C5a sind Spaltprodukte, die bei der Aktivierung des Komplementsystems anfallen. Es sind Entzündungsmediatoren, die durch im Plasma zirkulierende Carboxypeptidasen kontrolliert werden. C3a und C5a bewirken beide eine Depolarisation von Mastzellen und basophilen Granulozyten, was zu einer Histaminfreisetzung führt. Histamin bewirkt eine Kontraktion glatter Muskelfasern und eine Auflockerung der Gefäßwand; damit verbunden

ist eine Steigerung der Vasopermeabilität, dies wiederum führt zur Ausbildung von Ödemen. C3a und C5a besitzen noch eine Reihe weiterer, jeweils spezifischer Wirkungen, die über entsprechende Rezeptoren vermittelt werden: C3a bewirkt Serotoninfreisetzung aus Thrombozyten, außerdem zeigt C3a eine zytotoxische Wirkung auf Tumorzellen, Mykoplasmen, Bakterien-L-Formen. C5a besitzt chemotaktische Eigenschaften, d.h. weiße Blutzellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen) werden zur Wanderung angeregt. Infolge dieser 'Chemotaxis' kommt es zur Leukozyteninfiltration des entzündlich veränderten Gewebes. Gleichzeitig erfolgt eine Freisetzung lysosomaler Enzyme aus neutrophilen Granulozyten.

C3a und C5a spielen eine wichtige Rolle bei der Schaffung eines Milieus, in der die Entzündungsreaktion ablaufen kann.
(5, 23, 26, 29, 33, 35, 37)

1.3.5. Reaktionsschritte des Terminalwegs

Der Terminalweg besteht aus einer Sequenz von Aktivierungsschritten, wobei die lytisch wirksame Form der einzelnen Intermediärkomplexe ausgehend von C5b6 durch Konfigurationsänderungen der Komplementkomponenten C7, 8 und C9 entsteht. (Im Gegensatz dazu erfolgt im klassischen und alternativen Weg eine successive Aktivierung der Einzelkomponenten durch enzymatische Spaltung.) Der Komplementkomplex C5b6789 besitzt keine enzymatische Aktivität. Die Fähigkeit zur Interaktion mit der Membran und zur Zerstörung von Membranstrukturen beruht auf Strukturmerkmalen des membrane attack complex (MAC). Die Aktivierung des Terminalwegs führt zur Entstehung eines multi-unit-complex C5b - 9, der eine in die Bilayer-Konformation der Membran passende Anordnung seiner hydrophilen und lipophilen Anteile aufweist. Der Komplex zeigt deshalb spontane Interaktion mit der Membran. Er bildet in seinem in die Membran eingebauten Zustand einen Kanal, eine im Elektronenmikroskop darstellbare 'lytische Läsion'. Sie ist das Substrat der zytotoxischen Funktionseigenschaften der aktivierten Komplementkaskade. (3, 4, 5, 13, 23, 24, 25, 26, 28, 35, 37, 38)

1.3.5.1. C5-Aktivierung, Stabilisierung durch C6, Interaktion des C5b6-Komplexes mit der Membran

Auf dem Niveau der C5-Aktivierung münden der klassische und der alternative Aktivierungsweg in eine gemeinsame terminale Endstrecke ('Terminalweg'). C5 wird durch eine der beiden C5-Konvertasen assoziiert und anschließend in zwei Fragmente C5a (ein Entzündungsmediator, s.o.) und C5b gespalten. Das größere Fragment C5b ist sehr stabil und bleibt zunächst an den Intermediärkomplex assoziiert. Trotz struktureller Analogien zu C3b und C4b, die eine kovalente Bindung der C5b-Komponente an die Membran erwarten ließen, tritt keine derartige Reaktion ein. C5b wird noch in seinem an das C3b-Molekül gebundenen Zustand durch C6 stabilisiert. Die C5b-Stabilisierung ist die einzige Funktion der C6-Komponente. Ohne C6 zerfällt das naszierende C5b in eine inaktive Form und dissoziiert in die flüssige Phase. Das C5b-Molekül besitzt neben einer Membranbindungsstelle, die eine direkte, aber nicht kovalente Interaktion mit der Membran ermöglicht, noch weitere Bindungsstellen für C7 und C8. C5b ist nach seiner Reaktion mit C6 als C5b6-Komplex sehr stabil. Zunächst erfolgt eine reversible Bindung an die Membran. C5b6 kann aber auch unter Erhaltung seines aktivierten Zustands in die flüssige Phase abdissoziieren. Seine Fähigkeit, den lytischen Prozeß einzuleiten, bleibt für längere Zeit erhalten. Die Fähigkeit, sich in den Lipid-Bilayer einzubauen, ist im Vergleich zum MAC noch sehr schwach ausgeprägt. Der C5b6-Komplex kann ohne weiteres wieder aus der Membran entfernt werden. Dies ist in späteren Stadien nicht mehr der Fall. Eine geringfügige Erniedrigung des elektrischen Membranwiderstands als Zeichen der Membraninteraktion kann aber schon in diesem Stadium nachgewiesen werden. Neben der Aktivierung der C5-Komponente durch enzymatische Spaltung gibt es noch eine weitere Aktivierungsmöglichkeit: Im sauren Milieu kommt es zur spontanen Interaktion zwischen C5 und C6, wobei ein C56-Komplex gebildet wird, der den terminalen Weg anlaufen läßt. (1, 5, 9, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 41)

1.3.5.2. Der C5b67-Komplex

Der lytische Prozeß beginnt mit der Formation des C5b67-Komplexes aus C5b6 und C7. Der Komplex C5b67 bereitet die Membran auf die Lyse mit C8 und C9 vor. Die C5b6/C5b67-Konversion ermöglicht eine bessere Membraninteraktion. C7 verfügt über eine C8-Bindungsstelle und ermöglicht eine Interaktion des C5b67-Komplexes mit dem hydrophilen Anteil der Membran. C5b67 entwickelt eine kurzlebige, starke Bindungsstelle, die eine Fixierung an Zellmembranen erlaubt. Es kommt zum Einsinken des Komplexes in den Lipid Bilayer. Dies ist dadurch bedingt, daß C5b und C7 hydrophobe Anteile enthalten, die exponiert werden, sobald C5b6 mit C7 zum Komplex C5b67 reagieren. Diese hydrophoben Anteile neigen dazu, mit anderen hydrophoben Molekülen wie z.B. der Hydrocarbonschicht eines Lipid Bilayers in Wechselwirkung zu treten. Deshalb kann der Komplex in die Membran eindringen.

Naszentes C5b67 kann unabhängig von anderen membrangebundenen Komponenten des alternativen und klassischen Wegs mit biologischen Membranen reagieren, jedoch wird die Membraninsertion des C5b67-Komplexes durch vorhandenes, membrangebundenes C3b günstig beeinflußt (s.u.). Naszentes C5b67 hat eine HWZ von weniger als 0,1 sec., nur während dieser Zeit ist eine Membraninteraktion möglich. Das Produkt dieser Reaktion ist stabil. Kommt es nicht zu dieser Membraninteraktion, geht die Fähigkeit des C5b67-Komplexes, mit Membranen zu reagieren, sehr schnell verloren. Naszentes C5b67 ist ein instabiler Komplex, der eine stabile Konfiguration entweder durch Interaktion mit den hydrophoben Anteilen einer Membran oder durch eine Konfigurationsänderung erhält, die die hydrophoben Anteile des Komplexes in Innern verschwinden läßt.

Einfluß des zellgebundenen C3b auf die Lyseaktivität bzw. Lokalisation des naszenten C5b67-Komplexes auf der Membran

Unzählige, zellgebundene C3b-Moleküle, die entfernt von C4b2a3b-Komplexen lokalisiert sind, stellen einen wichtigen Faktor für die lytische Aktivität des C5b6-Komplexes dar: Der lytische Effekt des C5b6-Komplexes kann durch zellgebundenes C3b auf das

100-fache gesteigert werden. Die Adsorption des Intermediärkomplex C5b6 und C5b67 an die Membranoberfläche wird durch zellgebundenes C3b begünstigt.

(5, 13, 16, 24, 26, 27, 28, 29)

1.3.5.3. C5b678 und C5b6789

Der Komplex C5b67 nimmt nacheinander C8 und C9 auf (C8 trägt die Bindungsstelle für C9). Damit ergeben sich Konformationsänderungen der einzelnen Komponenten und modifizierte physikalisch-chemische Eigenschaften: C5b67 hat im Vergleich zu C5b678 und C5b6789 eine wesentlich schwächere Tendenz zur Membraninteraktion. Der MAC besitzt Strukturanteile, die in Wechselwirkung zu den lipophilen Elementen in der Membraninnenschicht treten (z.B. beträgt die Lipidbindungskapazität des MAC 1000 Phospholipidmoleküle pro C5b6789-Komplex und ist damit etwa 100 x höher als bei anderen Serumproteinen). Hieraus resultiert eine hohe Eindringtiefe in die Membran bzw. eine Penetration durch die Membran. Die lytische Aktivität des MAC, die an der BLM als Leitfähigkeitssteigerung meßbar ist, ist Folge des Einbaus des MAC in die Membran. Durch die Ausbildung hydrophiler Kanäle in der Membran kommt es zur osmotischen Zell-Lyse und damit zum Zusammenbruch der Zellfunktionen. Die Größe des Membrankanals und damit die Lyseeffektivität des MAC ist von der Komplementkonzentration, insbesondere von der Konzentration des Komplementkomponente C9 abhängig. C9 kann sich in unterschiedlicher Anzahl an den C5b678-Komplex anlagern, je nach Anzahl resultieren kleinere oder größere Kanäle. Der mittlere Durchmesser bewegt sich in der Größenordnung 10 nm. Dies bedeutet freie Passage für Moleküle bis zu einem Massengewicht von 40.000. Die Stabilität eines MAC ist hoch, die HWZ kann Tage betragen.

(1, 4, 6, 7, 8, 17, 23, 25, 27, 28, 29, 30, 34, 35, 37, 39)

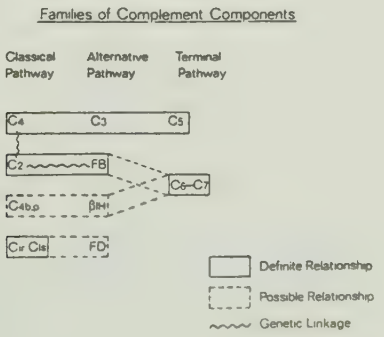
1.3.6. Evolution des Komplementsystems

Die ursprüngliche Funktion des Komplementsystems auf einer sehr

frühen Stufe der Evolution bestand vermutlich in einer Spaltung von C3 durch ein Enzym C3bB. Von diesem C3-Rückkopplungskreis könnten sich durch Genmutation und -duplikation weitere Komplementfaktoren entwickelt haben. Verschiedene Komponenten des Komplementsystems zeigen aufgrund ihrer genetischen Verwandschaft ähnliche Struktur und Funktion (Abb. 1.13). Die Erweiterung des 'Archäokomplementsystems' um proteinase-inhibitor-resistente, enzymatisch wirksame Komponenten (z.B. Faktor D) und um Kontrollproteine (beta-1H und KAF) ist möglicherweise Ausdruck einer Anpassung und Weiterentwicklung dieses primitiven Komplementsystems an die zunehmende Komplexität höherer Organismen.

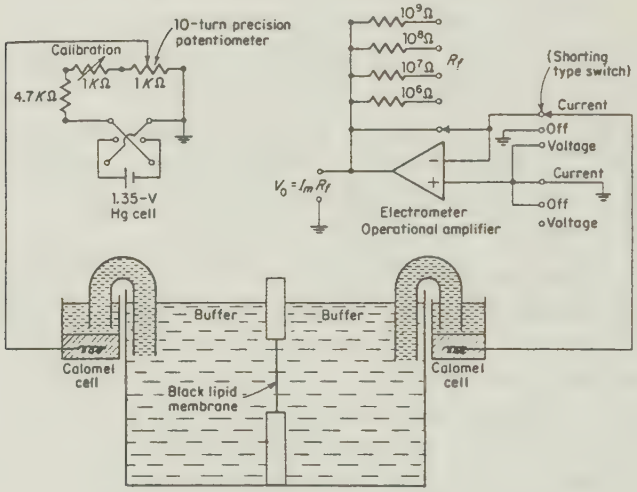
Die Originalfunktion des Komplements besteht in einer an C3 gekoppelten, nicht-spezifischen Immunabwehr, wobei C3a als Entzündungsmediator, C3b als Opsonin fungiert. Die Komponenten des alternativen Komplementwegs sind wahrscheinlich das Produkt von Genmutationen. Mit dem klassischen Weg kann die unspezifische Abwehrfunktion durch antikörpervermittelte Reaktionen getriggert werden. Ob der Terminalweg einer weiteren Verdopplung des Genbestands entspricht, wird diskutiert. In diesem Fall hätte sich das Komplementsystem eine vollkommen neue Funktion, die Membran-Lyse, erworben. (23, 24)

Abb. 1.13 Familien von Komplementkomponenten
(modifiziert nach 24)
C4bp = C4-binding protein



2.1. Das experimentelle Modell

Abb. 2.1 Versuchsanordnung (modifiziert nach 18)



Das Modellsystem besteht aus einer Teflon-Meßkammer (Teflon bietet als chemisch inertes Material keine zusätzlichen Störfaktoren), die durch eine Trennwand in zwei Hälften unterteilt wird. Beide Hälften stehen lediglich über ein kleines Loch in der Trennwand von 1mm Durchmesser in Verbindung. Dieses Loch kann mit einem Beobachtungsmikroskop durch ein Fenster eingesehen werden. Beide Kammern sind mit Flüssigkeit gefüllt (in dieser Untersuchung mit 1-molarer KCl-Lösung oder isotonem Na-Phosphat-Puffer pH 7,4). Bei ausgeglichenem Flüssigkeitsstand wird mit einem Pinsel unter Sicht ein dünner Lipidfilm (in N-Dekan gelöstes Lipid) über das Loch 'gespannt'. Man erhält somit ein Zwei-Kompartiment-System, beide Kammern sind vollständig voneinander getrennt.

Die Messung des transmembranären Stroms erfolgt über zwei KCl-Elektroden, die in die Flüssigkeit eingetaucht werden. Vergleicht man die Leitfähigkeit des Systems ohne Membran (Systemleerwert) mit der Leitfähigkeit des Systems mit aufgezogener Membran (MLW,

Membranleerwert), so zeigt sich eine charakteristische Abnahme der elektrischen Leitfähigkeit bzw. Zunahme des elektrischen Widerstands um den Faktor 1 : 1.000.000 . Die elektrische Leitfähigkeit der Teflonkammer kann gegnüber der Leitfähigkeit der Lipidmembran vernachlässigt werden. Die elektrischen Charakteristika des Systems hängen somit praktisch ausschließlich von den Eigenschaften der Lipidmembran ab. Als Spannungsquelle dient eine stabilisierte Gleichspannung von 20 mV.

Die Temperatur des Systems wird durch einen Metallblock, in den die Teflonkammer eingelassen ist, während aller Messungen konstant auf 32 °C. gehalten.

Bei allen Messungen ist auf die Minimierung der Artefakte zu achten. Hierbei spielen insbesondere zwei Störgrößen eine wichtige Rolle: Es werden Ströme bis in den Bereich von 10^{-13} A gemessen. Verständlicherweise ist das System deshalb sehr empfindlich gegen elektrostatische Entladungen in der näheren Umgebung. Alle elektrischen Leitungen der Apparatur müssen deshalb einwandfrei abgeschirmt sein, die Teflonkammer selbst ist in einem Farady-Käfig, einer allseitig geschlossenen Metallbox untergebracht. Auch mechanische Erschütterungen können Störungen im elektrischen Verhalten des Systems verursachen: Sie erzeugen hydrostatische Druckwellen in der Flüssigkeit in der Meßkammer, die zu Läsionen der Membran führen. Die gesamte Versuchsanordnung wird deshalb mit Schaumstoffpolstern und einem aufblasbaren Gummischlauch erschütterungsfrei gelagert.

2.2.1. Die Lecithinmembran als Membranleerwert

Die Strom-Meßwerte werden in ein Strom-Zeit-Diagramm eingetragen. Eine Stunde lang werden im 2 1/2 min.-Takt Meßwerte aufgenommen (eine Nullpunkt-Eichung muß bei Bedarf bei jedem einzelnen Meßwert durchgeführt werden). Abb. 2.2 zeigt einige typische Leerwertsmessungen.

Sind im wässrigen Milieu außer Elektrolyten keine weiteren Stoffe (Proteine, Detergentien, organische Lösungsmittel und sonstige Verunreinigungen) enthalten, ergibt sich nach Auftragen der Lipidmembran eine Kurve, die im Prinzip immer gleich aussieht:

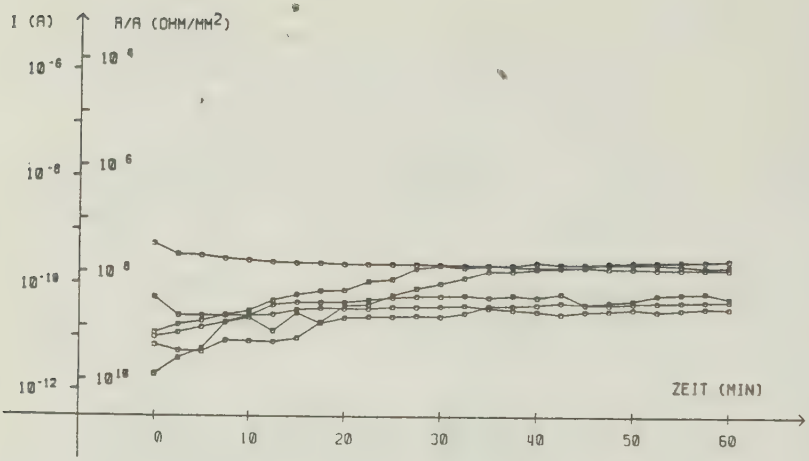


Abb. 2.2 Membranleerwert

Nach unterschiedlich großen Schwankungen in den ersten 5 - 10 min. treten Gleichgewichtsbedingungen ein, man erhält im Idealfall eine Parallele zur Zeit-Achse, evt. eine mit zunehmender Zeit langsam ansteigende Stromkurve (Abb. 2.2). Die Anfangsschwankungen entsprechen der allmählichen Ausbildung der BLM, also der

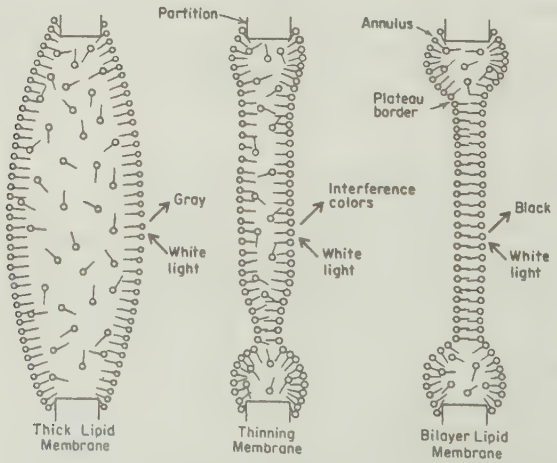


Abb. 2.3 allmähliche Ausbildung der Lipidmembran (nach 18)

bimolekularen Lipidschicht. Im Mikroskop beobachtet man, daß die Membran schwarz wird. Anschließend herrschen Gleichgewichtsbedingungen. Unter idealen Voraussetzungen tritt keine Änderung der Membranleitfähigkeit mehr ein. Kommt es dennoch zu einer sprungweisen oder konstanten Erhöhung der Membranleitfähigkeit, so ist dies auf Störungen im System zurückzuführen (diese Störungen können auch künstlich provoziert werden): Mechanische Alterationen durch Erschütterungen, Verunreinigungen des wässrigen Milieus (z.B. mangelhafte Reinigung der Versuchanordnung vor Versuchsbeginn), elektrostatische Artefakte, chemische Alterung des Lipids (Oxidation), ungleicher oder sich ändernder hydrostatischer Druck in beiden Kammern durch unterschiedliche Flüssigkeitsspiegel (möglicherweise ist eine Kammer undicht). Vor jedem Meßzyklus muß das System durch einen Membranleerwert auf seine Funktionstüchtigkeit überprüft werden. Kriterien für die Beurteilung eines Membranleerwerts sind der absolute Wert des Membranwiderstands, die Stabilität der Membran über 1 Std. (keine Lyse!) und das Eintreten von Gleichgewichtsbedingungen nach 5 - 10 min.

2.2.2. WW Valinomyzin - Lecithinmembran als (qualitative) positive Kontrolle

Valinomyzin ist eine makrozyklische Substanz, die sich aufgrund ihrer chemischen Beschaffenheit spontan in Membranen einbaut und als 'Pore' oder 'Kanal' Kalium-spezifische Diffusion erlaubt. Dieser Effekt zeigt sich auch an der BLM (Abb. 2.4): Bereits bei einer Konzentration von 10^{-8} mol/l in 1-molarer KCl-Lösung tritt sofort eine in den ersten 10 bis 20 min. immer weiter fortschreitende Erhöhung der Membranleitfähigkeit auf. Nach 20 min. wird ein 10- bis 100-fach erhöhter Wert erreicht, der sich im weiteren Verlauf nicht mehr wesentlich ändert. Dieser Effekt läßt sich durch Erhöhung der Valinomyzin-Konzentration weiter steigern: Bei einer Valinomyzin-Konzentration von 10^{-7} mol/l zeigt sich eine Leitfähigkeitserhöhung von 1 : 100 bis 1 : 1.000. Eine weitere Steigerung des Effekts durch Konzentrationserhöhung ist nicht zu beobachten. Bedingt durch die schlechte Löslichkeit von Valinomyzin ist bereits bei einer Konzentration

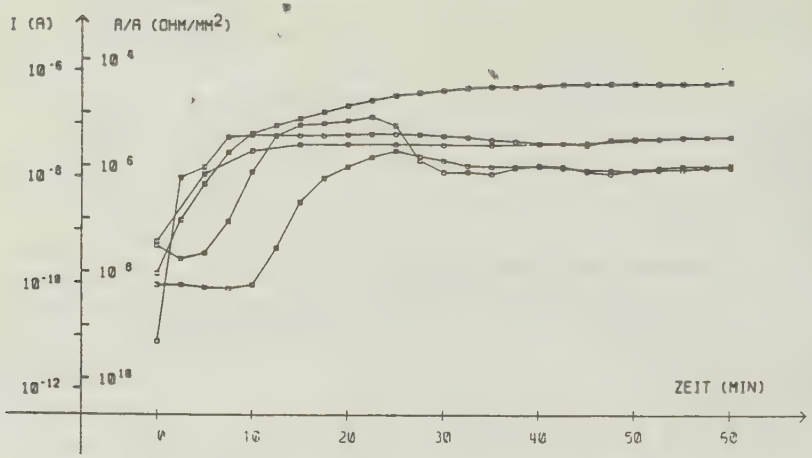


Abb. 2.4 Valinomyzin 10^{-7} mol/l

im Bereich von 10^{-7} mol/l die Sättigungsgrenze im wässrigen Medium erreicht.

Auf die spezifischen biochemischen Eigenschaften von Valinomyzin und die damit verbundenen charakteristischen Veränderungen an der Membran soll hier nicht im einzelnen eingegangen werden.

2.2.3. WW Serum - Lecithinmembran

Serum enthält eine Vielzahl verschiedener Substanzen, die zunächst durch drei große Gruppen näher eingeteilt werden können: Eiweiße, Kohlenhydrate und Fette. Viele Stoffe zeigen WW mit Membranen. Zunächst soll die Wirkung von nativem Serum bzw. bestimmter Serumfraktionen untersucht werden. Verwendung findet lyophilisiertes Meerschweinchenserum (Behring ORAY 196016048670/8) und frisches Humanserum, außerdem drei verschiedene Humanserum-Fraktionen.

2.2.3.1. Meerschweinchenserum

In dieser Versuchsreihe werden die Effekte einer 1 %igen Lösung von Meerschweinchenserum in isotonischem Na-Phosphat-Puffer pH 7,4 auf die Lecithinmembran untersucht. Es werden 20 verschiedene Messungen durchgeführt und man erhält eine sehr heterogene Kurvenschar: Bei 17 Membranen tritt nach 10 bis 60 min. Lyse ein, die restlichen 3 Versuche führen zu keiner signifikanten Membranaktivität. Der Kurvenverlauf läßt im Vergleich zum MLW sogar noch auf eine Stabilisierung der Membran schließen: Diese Messungen zeigen eine noch geringere Membranleitfähigkeit als der MLW. Abb. 2.5 zeigt einige typische Messungen.

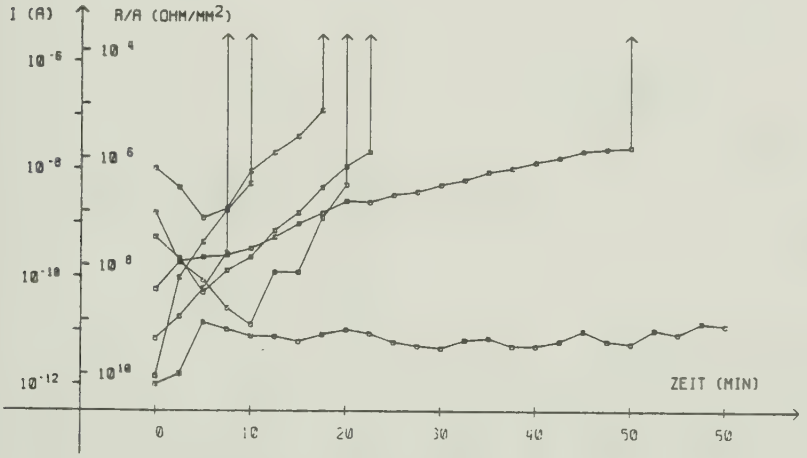


Abb. 2.5 Meerschweinchenserum 1 %

2.2.3.2. WW Serum von Ratte - Lecithinmembran

Insgesamt werden 6 Messungen im Konzentrationsbereich 0,06 % bis 0,5 % durchgeführt (Abb. 2.6). Bei fünf Messungen tritt Lyse ein, eine Membran zeigt eine dem MLW vergleichbare Stabilität. Der Vergleich mit Messungen von Humanserum zeigt, daß Serum von Ratten eine höhere Lyseaktivität besitzt als Humanserum. Dies wäre durchaus denkbar; in Analogie dazu ist

ja bekannt, daß Ratten im Vergleich zum Mensch ein höherpotentes Gerinnungssystem besitzen.

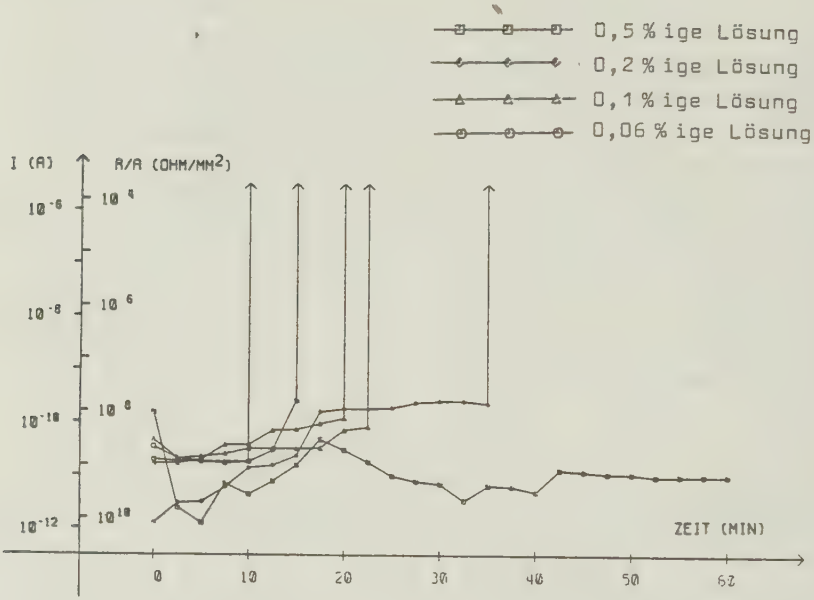


Abb. 2.6 Serum Ratte

2.2.3.3. Humanserum

Ähnliche Ergebnisse wie bei Meerschweinchenserum zeigen sich auch bei der Untersuchung von Humanserum (Abb. 2.7 - 2.11). Zunächst erfolgen die Messungen ebenfalls mit einer 1 %igen Serumverdünnung in isotonischem Na-Phosphat-Puffer pH 7,4. Die 1 %ige Serum-Lösung (Abb. 2.7) führt bei allen vier Messungen innerhalb der ersten 25 min. zur Membranlyse.

Eine niedrigere Serumkonzentration (0,1 %ige Lösung) zeigt erwartungsgemäß eine geringere Membranaktivität (Abb. 2.8). Trotzdem besteht immer noch eine erhebliche Streubreite der einzelnen Messungen untereinander: Die Hälfte der acht Messungen zeigen relativ stabile Meßwerte. Auch in der Meßreihe mit 0,1 %iger Serumverdünnung erhält man eine sehr variable

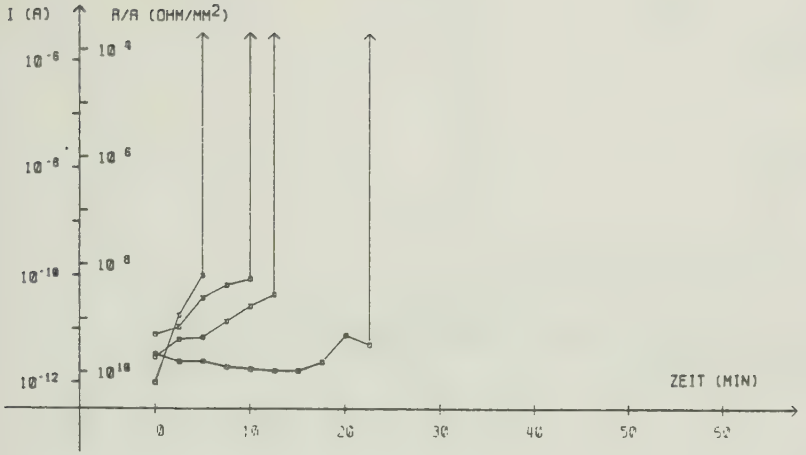


Abb. 2.7 Humanserum 1 %

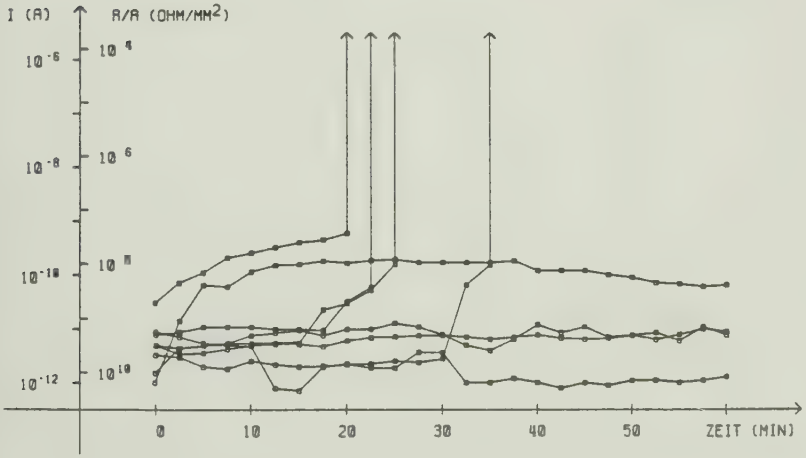


Abb. 2.8 Humanserum 0,1 %

Stabilität der Membranen, die sich in der sehr unterschiedlichen Kurvenform der einzelnen Messungen zeigt.

In einer weiteren Meßreihe wurde natives Humanserum fraktioniert und die einzelnen Fraktionen auf ihre Wirkung an der Membran

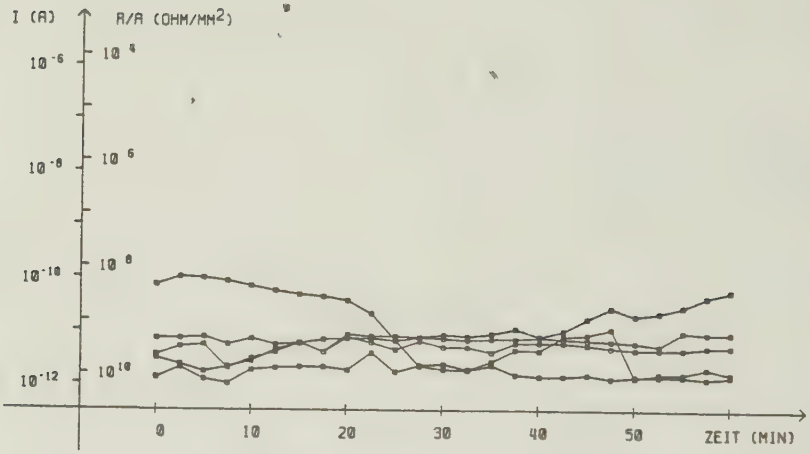


Abb. 2.9 Serum-Filtrat 25.000 1 %

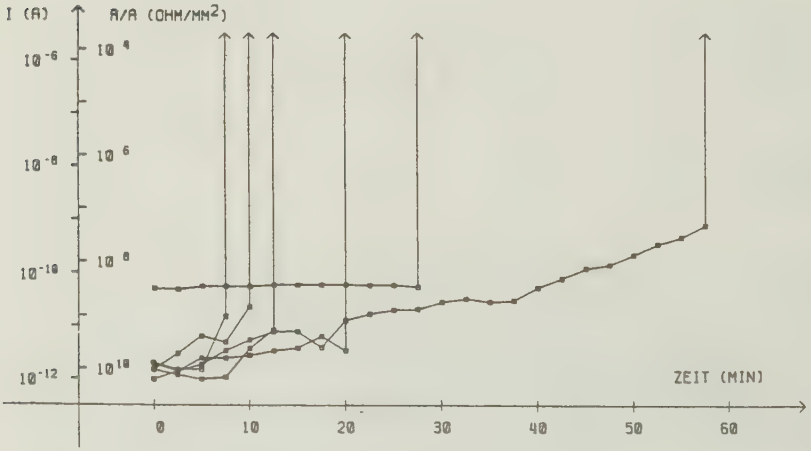


Abb. 2.10 Serum-Überstand 25.000 1 %

untersucht. Verwendung fanden 'centriflow ultrafiltration membrane cones CF 25 bzw. CF 50 ' der Firma Amicon (Lexington, Massachusetts 02173 USA). Es handelt sich um spezialbeschichtete Filterkegel, die zur Serumfraktionierung geeignet sind. Die

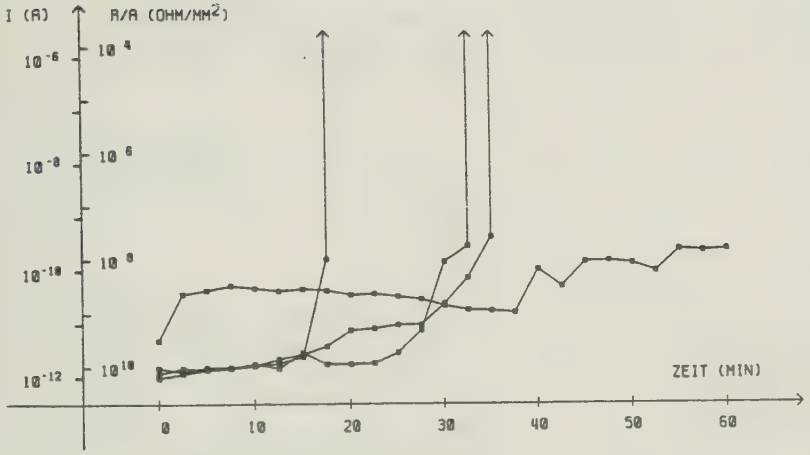


Abb. 2.11 Serum-Überstand 50.000

Fraktionierung erfolgt durch 20-minütiges Zentrifugieren, die niedermolekularen Bestandteile erscheinen im Filtrat, die hochmolekularen Bestandteile sind im Überstand. Je nach Typ des Filterkegels liegt die Grenze im Molekulargewicht bei 25.000 (CF 25) oder 50.000 (CF 50). Die Messungen werden mit einer 1 %igen Lösung der jeweiligen Fraktion in Natrium-Phosphat-Puffer durchgeführt. Eine grobe Charakterisierung der membranaktiven Stoffe bezüglich ihres Molekulargewichts erscheint durch dieses Verfahren möglich: Während die niedermolekulare Serumfraktion (Molekulargewicht unter 25.000, Abb. 2.9) keine Lyseaktivität aufweist (keiner der 7 Versuchsansätze führte zur Membranlyse), kann in allen 7 Versuchen mit 1 %igem Serum-Überstand (Molekulargewicht über 25.000, Abb. 2.10) und in 4 von 5 Versuchen mit 1 %igem Serum-Überstand (Molekulargewicht über 50.000, Abb. 2.11) nach unterschiedlich langen Zeiträumen Lyse beobachtet werden.

Somit handelt es sich bei den Substanzen, die die Lipidmembran lysieren, um makromolekulare Stoffe mit einem Molekulargewicht von mehr als 25.000. Unter diese Stoffgruppe fallen z.B. viele Proteine (Hormone, Albumin, Globuline u.a.), die im Serum

vorhanden sind. Eine genauere Beschreibung der membranaktiven Substanzen aus diesem Versuchsansatz ist nicht möglich. Im folgenden werden einzelne Serumbestandteile auf ihre WW mit der Lecithinmembran untersucht.

2.2.4. WW nativer Serumbestandteile mit der Lecithinmembran

2.2.4.1. WW Albumin - Lecithinmembran

Die der 1 %igen Serumlösung äquivalente Albuminkonzentration beträgt (bei einem Normalwert von 4,0 g/dl) 40 mg/dl. Diese Konzentration entspricht also genau dem Albumin einer 1 %igen Serum-Lösung.

Die Messungen werden mit unterschiedlichen Albuminkonzentrationen durchgeführt: a) Albuminkonzentration 10 mg/dl (entspricht einer 0,25 %igen Serumkonzentration, Abb. 2.12) : Hier ergeben sich keine auffälligen Effekte. In dieser Konzentration wird keine Permeabilitätsänderung als Folge einer albumininduzierten Membranveränderung beobachtet. b) Bei höheren Konzentrationen (0,5 %ige, 1,5 %ige und 5 %ige Lösung, Abb. 2.13) ist eine Membranlyse möglich, aber nicht obligatorisch.

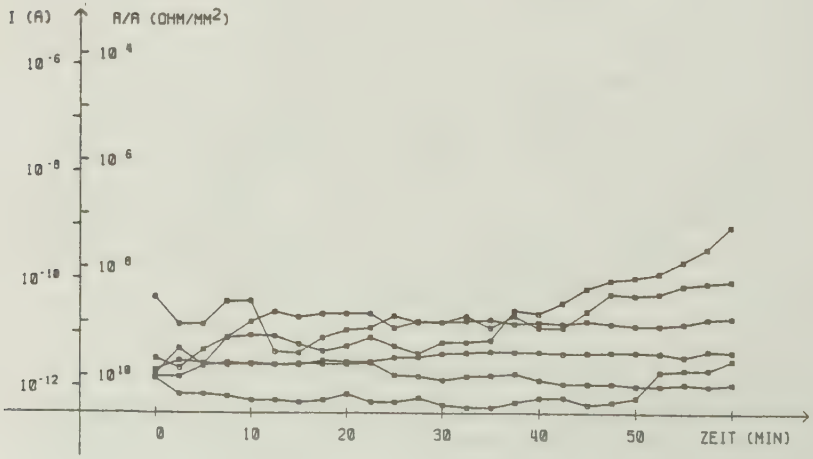


Abb. 2.12 Albumin 0,25 %

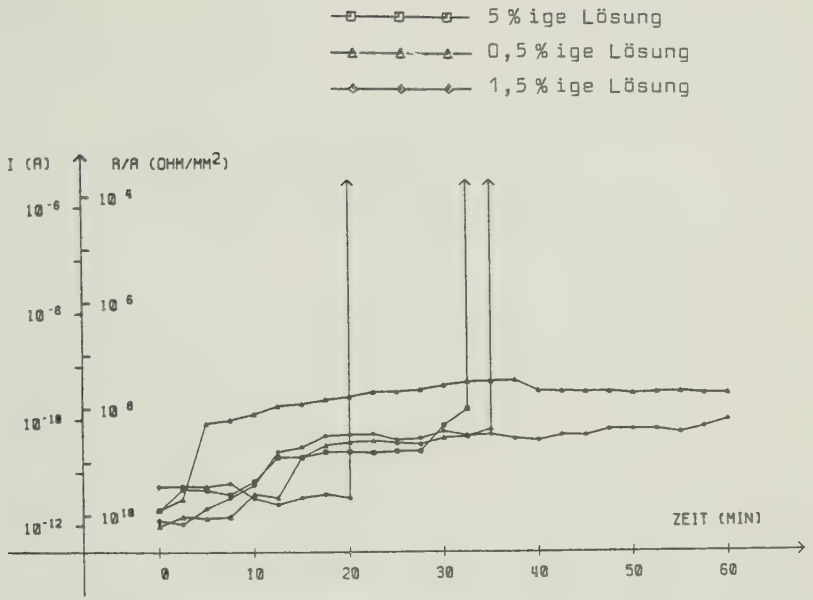


Abb. 2.13 Albumin 0,5 - 5 %

2.2.4.2. WW Human-IgG - Lecithinmembran

Legt man eine physiologische IgG-Konzentration von 1 g/dl zugrunde, so entspricht der 1 % igen Serum-Lösung eine IgG-Konzentration von 10 mg/dl. In dieser Konzentrationsstufe zeigen sich charakteristische, reproduzierbare Effekte an der Lecithinmembran (Abb. 2.14): In der Regel erfolgt innerhalb der ersten 20 min. ein Anstieg der Leitfähigkeit. Es wird ein Maximalwert erreicht (die Kurvenform ähnelt der durch Valinomyzin induzierten Membranveränderung) und beibehalten. Der erreichte Maximalwert liegt um den Faktor 1 : 10 bis 1 : 1.000 über dem MLW. Insgesamt werden 11 Versuche durchgeführt. 9 Versuche ergeben eine einheitliche Kurvenform, in einem Fall kommt es zur Lyse, in einem weiteren Fall zu keiner Veränderung der Membraneigenschaften gegenüber dem MLW.

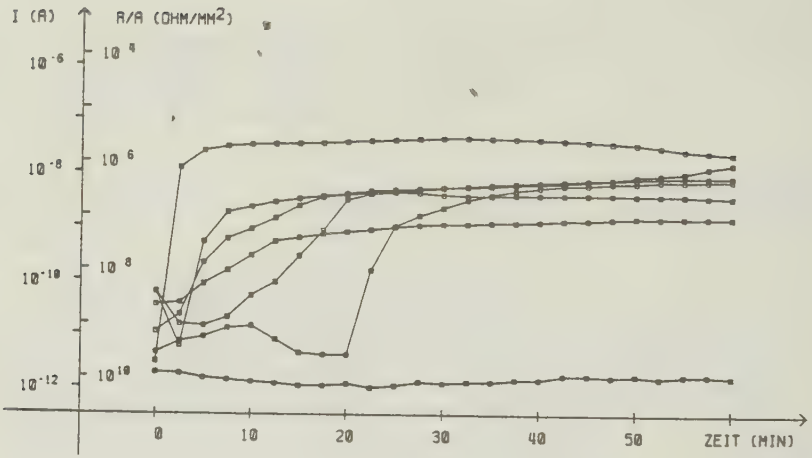


Abb. 2.14 IgG 1 %

2.2.4.3. WW Komplement - Lecithinmembran

Verwendet werden hochgereinigte Humankomplement-Fraktionen der Firma Cordis Laboratories Miami Florida, USA. Zu Beginn jeder

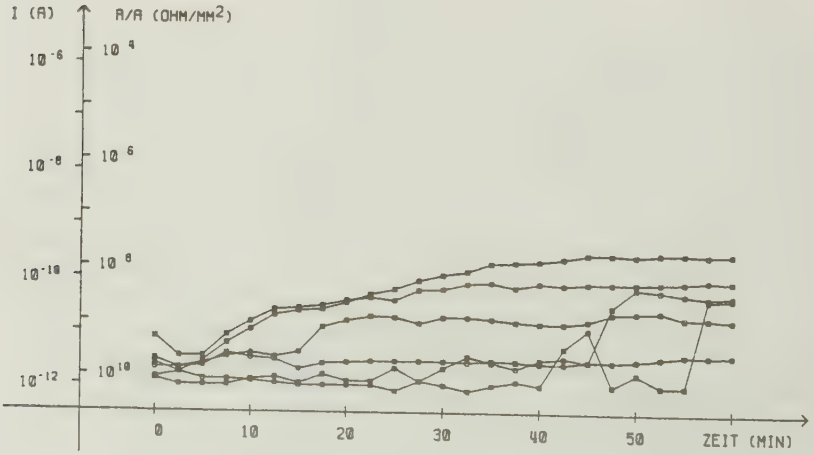


Abb. 2.15 Komplement

Meßreihe werden möglichst rasch nacheinander 1000 CH_{50}-Einheiten C1, 100 CH_{50}-Einheiten C2, C3 usw. bis C9 zu einem Grundvolumen von 10 ml isotonischem Na-Phosphat-Puffer pH 7,4 zugegeben. An der Lecithinmembran zeigen sich keine Permeabilitätsänderungen (Abb. 2.15), sodaß davon ausgegangen werden kann, daß es zu keiner Aktivierung der Komplement-Kaskade gekommen ist. Nur in einem von 9 Versuchen kommt es nach 25 min. zur Membranlyse.

2.2.5. Komplementaktivierung in vitro

2.2.5.1. Leerwerte

WW Zymosan - Lecithinmembran

Zymosan ist bezüglich seiner chemischen Eigenschaften (Molekularstruktur, Molekulargewicht usw.) ein nicht genau definiertes mikrobielles Polysaccharid-Gemisch unterschiedlich großer Moleküle mit starken antigenen Eigenschaften. Es spielt bei der Komplementaktivierung eine wichtige Rolle.

Zunächst muß untersucht werden, ob Zymosan an sich schon Veränderungen an der Membran verursacht (Abb. 2.16). In 11 Versuchen zeigt sich eine stark variable Kurvenform. Der über-

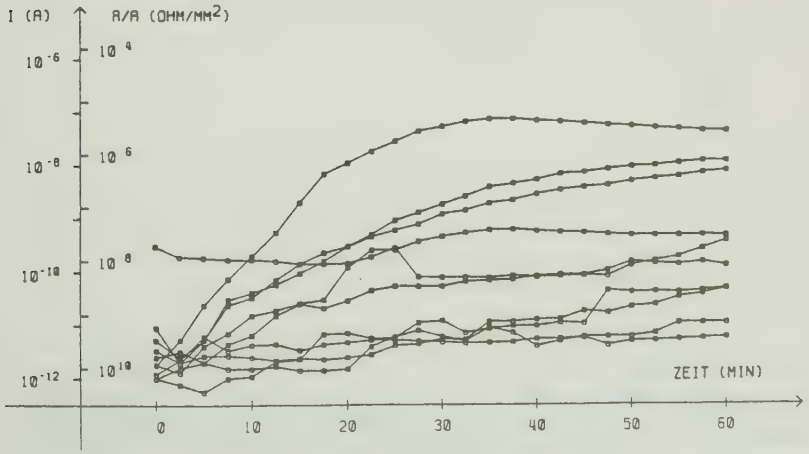


Abb. 2.16 Zymosan

wiegende Anteil der Kurven liegt in der Nähe des MLW, wenige Meßreihen sprechen für eine Permeabilitätserhöhung um den Faktor 1 : 100, nur in einem kleinen Teil der Versuche kommt es zur Lyse.

WW Zymosan/IgG - Lecithinmembran

IgG und Zymosan werden in denselben Konzentrationen wie in den isolierten Messungen mit IgG bzw. Zymosan untersucht. Erwartungsgemäß tritt ein Summationseffekt ein (Abb. 2.17). Es erfolgt eine Destabilisierung, die über die bei IgG oder Zymosan beobachteten Effekte hinausgeht: Die Membranleitfähigkeit steigt in der Regel über die ganze Meßzeit von 1 Std. immer weiter an, nach 60 min. wird eine Erhöhung der Membranleitfähigkeit von 1 : 50 bis über 1 : 1.000 erreicht, in drei von 11 Messungen kommt es zur Membranlyse (IgG und Zymosan produzieren in je einer von 11 Messungen eine Membranlyse).

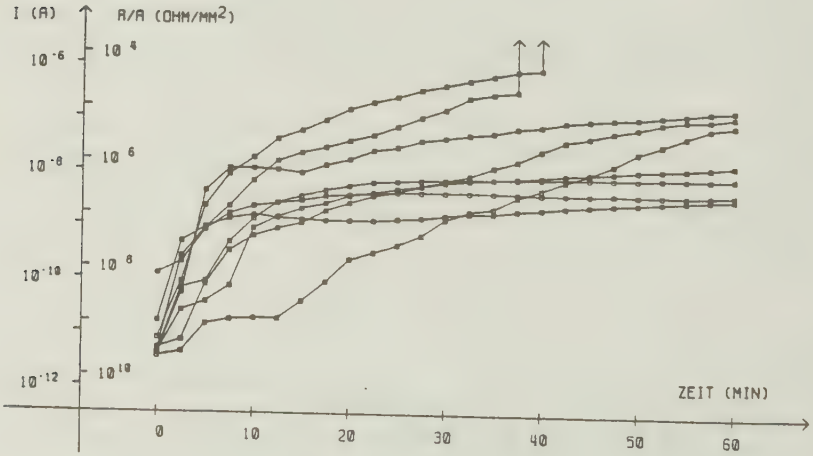


Abb. 2.17 Zymosan und IgG

WW Trypsin - Lecithinmembran

Trypsin vermag aufgrund seiner unspezifischen Esterase-Aktivität durch Spaltung einzelner Komplement-Komponenten die Komplement-

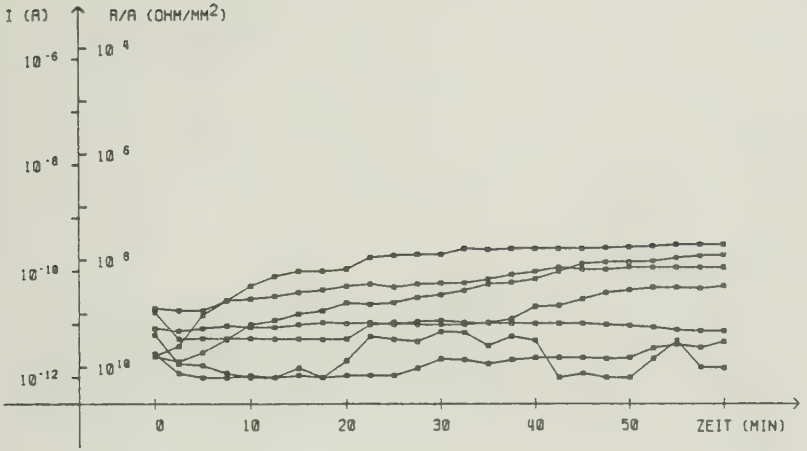


Abb. 2.18 Trypsin

Kaskade zu aktivieren. Trypsin ist nicht resistent gegen im Serum vorkommende Proteinase-Inhibitoren, deshalb kommt eine Aktivierung des Komplement-Systems durch Trypsin nur in vitro im inhibitorfreien Medium in Betracht.

Zunächst wird die Eigenaktivität des Trypsins auf die Lecithinmembran untersucht (Abb. 2.18). Es zeigt sich keine auffällige Erhöhung der Membranleitfähigkeit als Folge der Trypsinwirkung: Nur in einem von 9 Versuchen kommt es zur Lyse der Membran.

WW Kobravenom - Lecithinmembran

Kobravenom enthält ein C3b-Analogon, das resistent gegen alle im Humanserum vorhandenen Proteinase-Inhibitoren ist. Es aktiviert (auch unter physiologischen Bedingungen, d.h. im inhibitorhaltigen Medium) die Komplement-Kaskade.

Zunächst wird die Wirkung des Kobravenoms an sich auf die Lecithinmembran untersucht (Abb. 2.19 bis 2.22). Versuche mit 1 %iger Kobravenom-Lösung: In allen 11 Versuchen wird die Membran nach spätestens 15 min. lysiert. Versuche mit 0,1 %iger

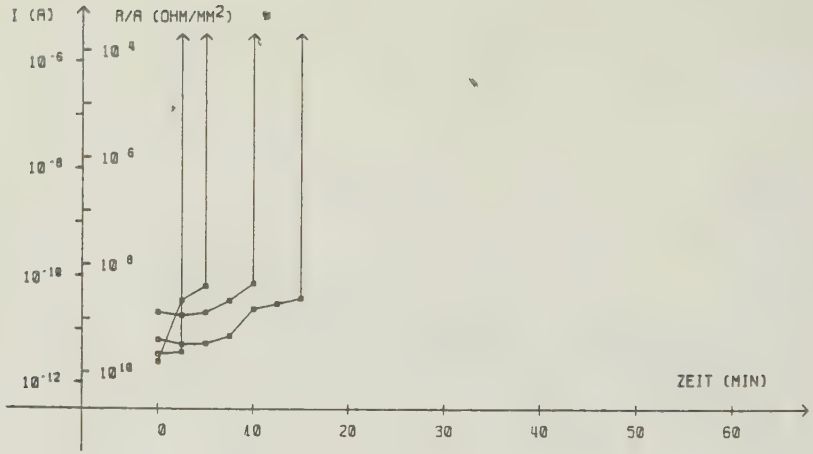


Abb. 2.19 Kobravenom 1 %

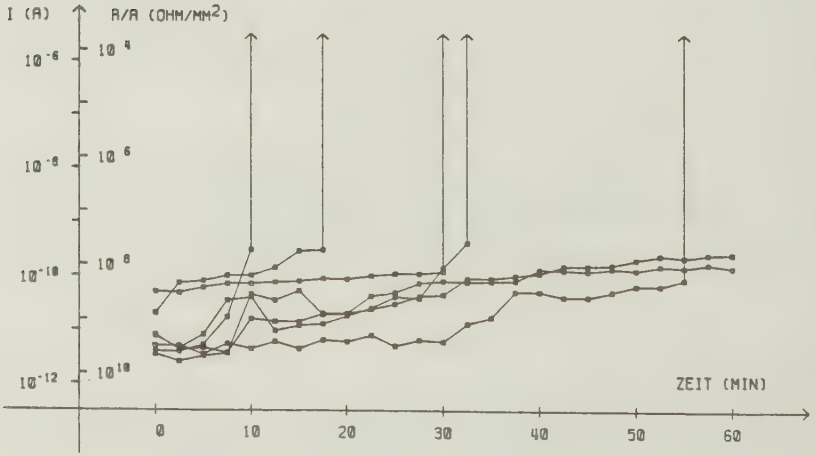


Abb. 2.20 Kobravenom 0,1 %

Kobravenom-Lösung (Abb. 2.20): Bei 11 von 14 Versuchen kommt es innerhalb von 60 min. zur Lyse. Die in dieser Zeitspanne nicht lysierten Membranen zeigen im Vergleich zum MLW eine geringfügig erhöhte Leitfähigkeit der Membran. Versuche mit 0,01 %iger

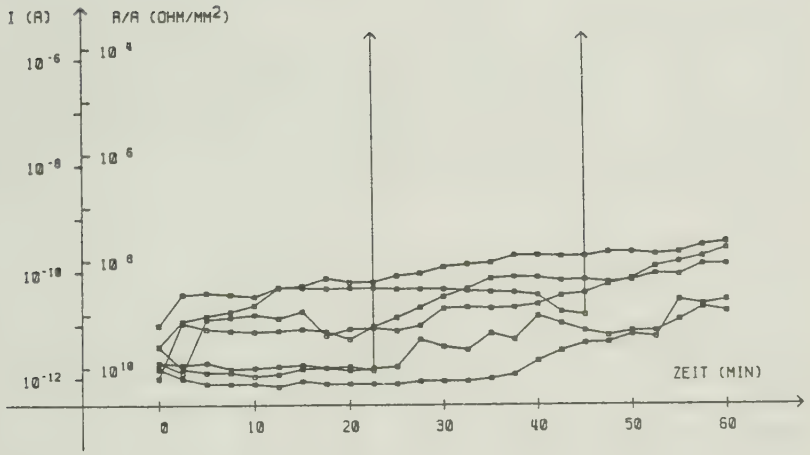


Abb. 2.21 Kobravenom 0,01 %

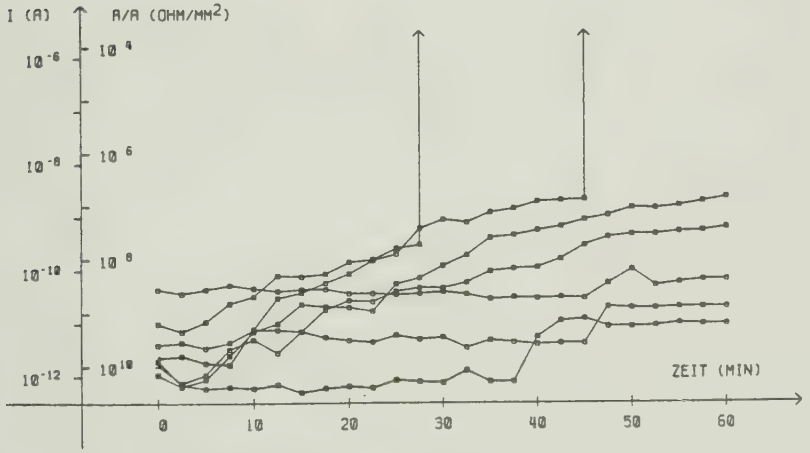


Abb. 2.22 Kobravenom 0,003 %

Kobravenom-Lösung: Erwartungsgemäß nimmt die Lyseaktivität im Vergleich zu den niedrigen Verdünnungen weiter ab. Zwei von 7 Membranen werden lysiert, die nicht lysierten Membranen zeigen im Vergleich zum MLW keine wesentlichen Abweichungen. Versuche

mit 0,003 %iger Kobravenom-Lösung (Abb. 2.22): Trotz der extrem hohen Verdünnung kommt es auch bei dieser Meßreihe noch regelmäßig zur Lyse oder unspezifischen Leitfähigkeitserhöhung der Lecithinmembranen. In 3 von 9 Fällen tritt eine Lyse ein.

Somit kommt aufgrund der starken Kobravenom-Eigenaktivität (evt. durch ebenfalls in Kobravenom vorhandene Lipaseaktivitäten) eine Untersuchung der Komplementaktivierung durch Kobragift in diesem Modell nicht in Betracht.

2.2.5.2. Komplementaktivierung

WW Albumin/Komplement - Lecithinmembran

Albumin wird in einer Konzentration zugrunde gelegt (10 mg/dl), die einer 0,25 %igen Serum-Lösung entspricht (Abb. 2.12). In dieser Konzentration ist die Eigenaktivität des Albumins bei keiner der durchgeführten Messungen so hoch (insgesamt 7), daß es aufgrund der Albuminaktivität zur Membranlyse käme (bei höheren Albuminkonzentrationen kann es durchaus zur Lyse kommen).

Auch die in der isolierten Komplement-Untersuchung verwendete Komplement-Konzentration wurde nicht verändert (Abb. 2.15), hier

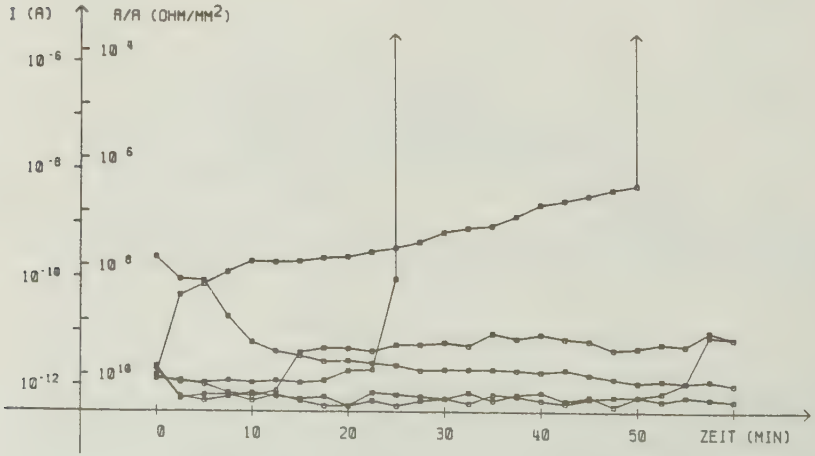


Abb. 2.23 Albumin und Komplement

kommt es in einem von 9 Fällen zur Lyse.

Bei der gleichzeitigen WW von Komplement und Albumin an der Lecithinmembran kommt es nun entweder zur Lyse (so in 3 von 10 Messungen) oder zu einer Stabilisierung der Membran (in diesen Messungen liegen die Meßwerte sogar noch unter denen des MLW). Dieses Phänomen ließe sich evt. als 'tick-over' bezeichnen, in dem Sinne, daß das Komplement eine gewisse 'Basisaktivierung' erfahren muß, um an der Membran zu meßbaren Effekten zu führen. Tritt keine Änderung ein, wäre die Hyperstabilisierung evt. damit zu erklären, daß sich Albumin und / oder nichtaktives bzw. inaktiviertes Komplement als Proteinkomponente an die Membran anlagert oder in die Membran einbaut und als solches zu einer Hyperstabilisierung der Membran führt.

WW IgG und Komplement - Lecithinmembran

Es werden die in den Einzeluntersuchungen zugrunde gelegten Konzentrationen verwendet. In den Messungen mit IgG (Abb. 2.14) erreicht die Membranleitfähigkeit in der Regel nach 20 min. einen Maximalwert, der sich nicht mehr oder nur noch geringfügig ändert. Dieses Sättigungsverhalten kann bei der Meßreihe 'WW IgG und Komplement - Lecithinmembran' (Abb. 2.24) nur in

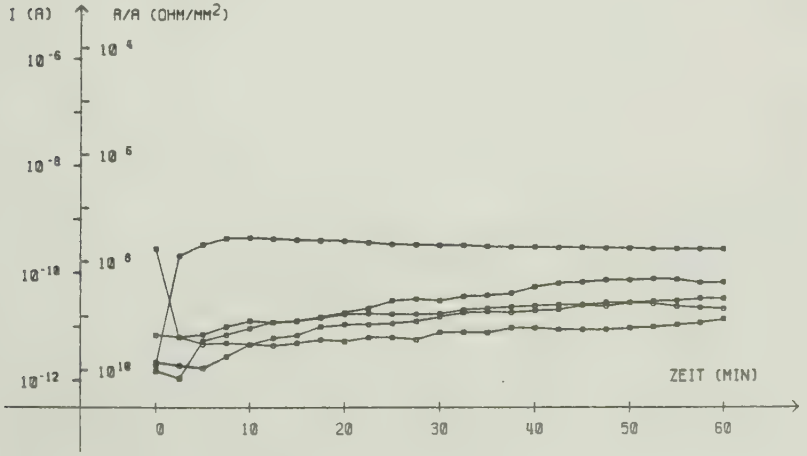


Abb. 2.24 IgG und Komplement

einer von 6 Messungen gefunden werden, allerdings liegt der nach 60 min. erreichte Wert nur geringfügig über dem MLW. Eine Membranlyse tritt bei einer Messung auf. In der Regel kommt es weder zur Komplementaktivierung, die sich als Erhöhung der Membranleitfähigkeit zeigen müßte, noch ergibt sich eine reproduzierbare IgG-induzierte Lyseaktivität des Komplements.

WW Zymosan und Komplement - Lecithinmembran

In dieser Meßreihe (Abb. 2.25) soll untersucht werden, ob Zymosan als Vertreter stark antigener Stoffe mittels Komplement ohne AK-Vermittlung zu einer Lyse der Membran führt. Es zeigt sich, ähnlich wie bei der Albumin/Komplement WW mit der Membran (Abb. 2.23) ein gewisses 'tick-over', d.h. es tritt entweder eine Hyperstabilisierung der Membran ein (dies zeigt sich in 4 von 6 Fällen), die gemessenen Werte liegen dann unter denen des MLW, oder es kommt zur Membranlyse als Folge der Aktivierung des Systems (in 2 von 6 Messungen). Möglicherweise muß es zu einer 'Basisaktivierung' des Systems gekommen sein, damit ein Schwellenwert erreicht wird und es zu einer Ausbildung der lytischen Aktivität des terminalen Komplementwegs kommen kann.

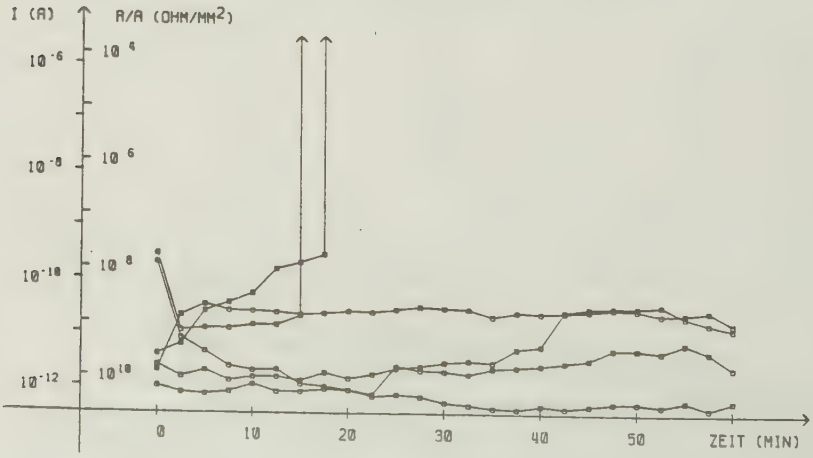


Abb. 2.25 Zymosan und Komplement

WW Zymosan/IgG/Komplement - Lecithinmembran

Es werden die Zymosan-, IgG- und Komplement-Konzentrationen zugrunde gelegt, die auch in den Messungen der einzelnen Substanzen verwendet werden (Abb. 2.16, 2,14, 2.15). Mit Zymosan als antigen wirkender Substanz, IgG als AK und Komplement als lytischem Effektorarm ist ein klassisches System vorhanden das alle notwendigen Komponenten der in vitro Aktivierung und Zytolyse (bzw. Membranlyse) enthält.

Auch bei der in vitro Untersuchung des Systems Zymosan - IgG - Komplement (Abb. 2.26) zeigt sich eine Membranaktivität, die sich in den Messungen als Leitfähigkeitserhöhung manifestiert. Die gemessenen Werte liegen in 3 von 7 Versuchen deutlich über den Werten des MLW, oder es kommt zur Lyse (dies tritt ebenfalls in 3 von 7 Messungen ein). Lediglich bei einer Messung kommt es zur Hyperstabilisierung. Die Interpretation der Meßwerte erscheint jedoch insofern erschwert, als die gemessene Aktivität des Systems auch als Summationseffekt der Aktivitäten der einzelnen Testsubstanzen (IgG, Komplement, Zymosan) verstanden werden kann. Für eine sichere Interpretation des Meßergebnisses als Komplementaktivierung sind die gemessenen Membranwerte (Lyse bzw. Erhöhung der Leitfähigkeit) nicht hoch genug.

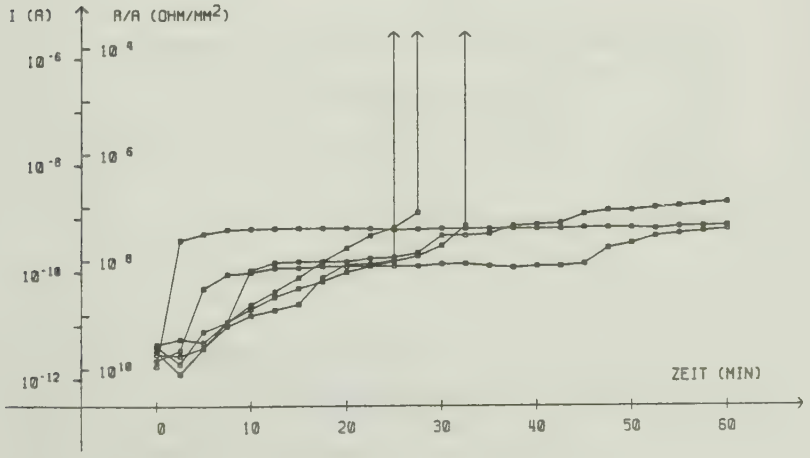


Abb. 2.26 Zymosan, IgG und Komplement

WW Trypsin/Komplement - Lecithinmembran

Im Gegensatz zur vorhergehenden Meßreihe zeigt die Untersuchung von WW zwischen Trypsin/Komplement und Lecithinmembranen Effekte, die sich durch eine reine Summationswirkung von Trypsin- und Komplement-Einzeleffekten sicher nicht erklären lassen (Abb. 2.27). Trypsin produziert in einer von 9 Messungen Membranlyse, Komplement zeigt die gleiche Relation. Erfolgt wie in dieser Meßreihe eine Aktivierung des Komplementsystems durch Trypsin, so zeigt sich in 5 von 9 Messungen eine Membranlyse. Die nicht lysierten Membranen bieten Meßwerte, die eine Hyperstabilisierung erkennen lassen, hier liegt die Membranleitfähigkeit erheblich unter dem MLW (bis zu einem Faktor 1 : 100). Dieses Phänomen, daß entweder eine Membranlyse oder eine Hyperstabilisierung eintritt, könnte dem 'tick-over'-Mechanismus der Komplementaktivierung entsprechen.

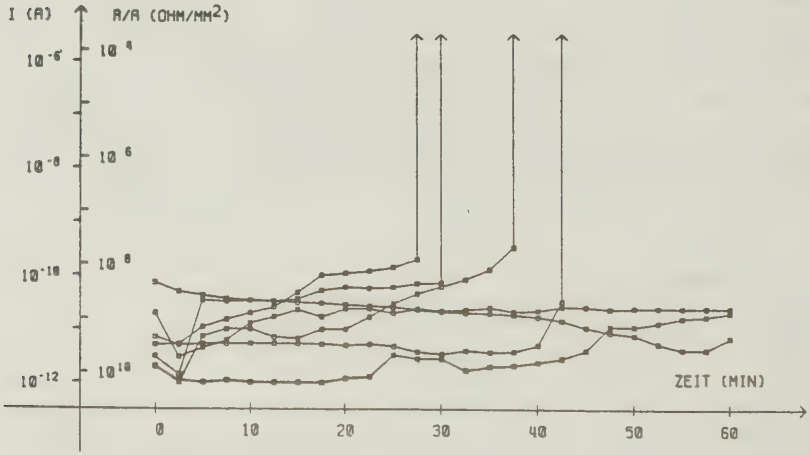


Abb. 2.27 Trypsin und Komplement

2.2.6. Untersuchung pathologischer Seren

WW Serum verbrannte Ratte - Lecithinmembran

Die Untersuchung der Seren verbrannter Ratten erfolgt mit

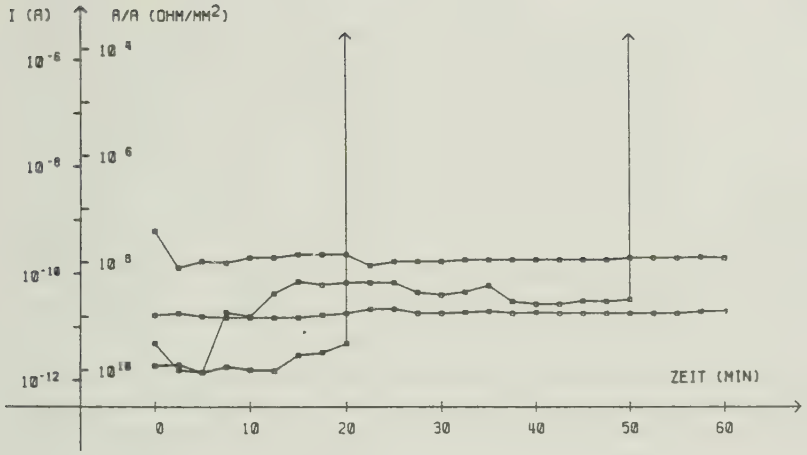


Abb. 2.28 Serum verbrannte Ratte 0,4 %

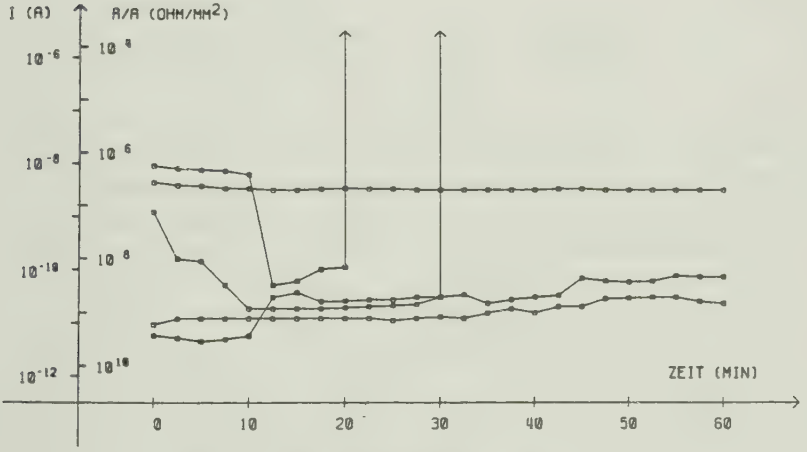


Abb. 2.29 Serum verbrannte Ratte 1 %

0,4 %iger, 1 %iger und 2 %iger Serum-Lösung (Abb. 2.28 bis 2.30). Eine Konzentrationsabhängigkeit (ähnlich den Messungen mit nativen Seren) ist aus den Meßwerten klar ersichtlich: Der Zeitraum, nach dem die Lyse eintritt, nimmt bei steigender

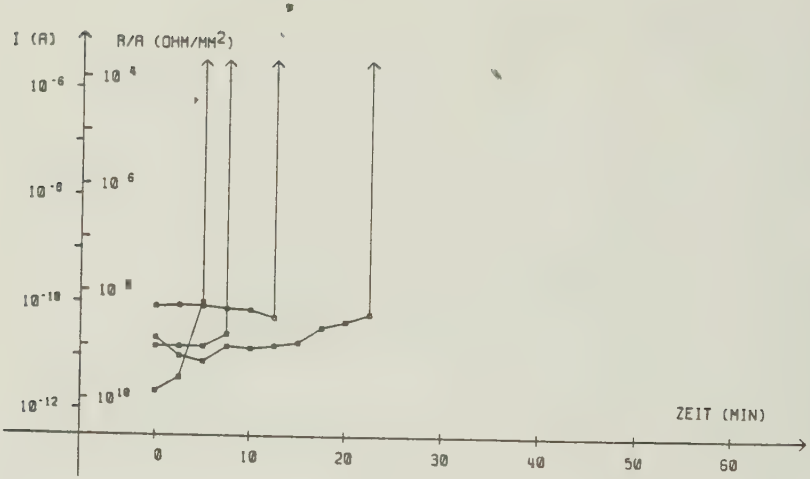


Abb. 2.30 Serum verbrannte Ratte 2,5 %

Konzentration ab. Auch tritt eine Lyse bei allen Messungen mit 2 %iger Serum-Lösung ein, bei den Ansätzen mit 1 %igem und 0,4 %igem Serum kommt es nur in 4 von 10 Messungen zur Lyse.

Der Vergleich mit nativem Rattenserum (Abb. 2.6) zeigt, daß die Laseaktivität der Seren verbrannter Ratten geringer ist. Offensichtlich handelt es sich bei den membranwirksamen Substanzen um hitzelabile Stoffe, deren Konzentrationen infolge des Verbrennungstraumas abnehmen.

2.3. Interpretation der Meßwerte

2.3.1. Membranleerwert

Im Idealfall erhält man eine Strom-Zeit-Kurve, die parallel zur Zeitachse verläuft, d.h. der Strom und damit auch der Membranwiderstand ist konstant und zeigt keine Abhängigkeit von der Zeit. Dieser Idealfall wird nur selten erreicht, in der Regel zeigen sich mehr oder weniger starke Schwankungen v.a. in den ersten 10 min., in dieser Zeit weist die Membran

erheblich inkonstante Eigenschaften auf. In dieser Anfangsphase muß sich die ideale räumliche Bilayer-Anordnung erst einstellen. Die Anordnung der Lipide als Doppelschicht läßt sich im Beobachtungsmikroskop am Schwarzwerden der Membran erkennen. Auch die elektrischen Eigenschaften sind dann nur noch wesentlich geringeren Schwankungen unterworfen. Ist dieser Zustand der Membran einmal erreicht, müßte der transmembranäre Strom jetzt einen konstanten Wert annehmen: Es herrschen Gleichgewichtsbedingungen. Experimentell läßt sich dies in erster Näherung bestätigen, die Leitfähigkeit hat die Tendenz, langsam auch nach Schwarzwerden der Membran weiter anzusteigen. Manche Membranen haben aber auch die Tendenz, daß die Leitfähigkeit ein Maximun erreicht und schließlich wieder leicht abfällt. Der Leitfähigkeitsanstieg läßt sich damit erklären, daß die Lipidanordnung in der räumlich und energetisch günstigsten bimolekularen, schichtweisen Anordnung möglicherweise erst nach längerer Zeit voll errsicht wird. Anfangs besteht die Membran aus vorwiegend ungeordneten, multilamellären Anteilen mit relativ höherem elektrischen Widerstand, der in der folgenden Zeit in Abhängigkeit vom Grad der Ausbildung der bimolekularen Lipidmembran geringfügig abnimmt. (Zur allmählichen Ausbildung der bimolekularen Lipidmembran siehe auch Abb. 2.3) Diese Überlegung würde ein leichtes, kontinuierliches Ansteigen der Stromwerte in Abhängigkeit von der Zeit bis zu einem Maximalwert bedeuten. Erfahrungsgemäß handelt es sich um einen Anstieg der Leitfähigkeit um eine halbe bis maximal eine Zehnerpotenz. Manchmal fällt die Leitfähigkeit der Membran ab einer bestimmten Zeit wieder leicht ab. Auch dies kann als Stabilisierung der Membran insofern verstanden werden, als auch eine optisch schwarze Membran noch 'Fehlstellen' enthält, deren Zahl im Zuge der Entstehung einer in möglichst hohem Maße geordneten molekularen Anordnung der Lipide immer weiter abnimmt. 'Fehlstellen' sind Areale relativer molekularer Unordnung in der Membran mit erhöhter elektrischer Durchlässigkeit infolge der räumlich ungünstigen Anordnung der Lipidmoleküle. Der Anteil dieser Fehlstellen-Areale nimmt als Funktion der Zeit ab. Dies zeigt sich in der Strom-Zeit-Kurve als Abfall der Membranleitfähigkeit.

Häufig weist die Kurvenform jedoch neben den genannten Eigenschaften Störungen auf, die auf Artefakte schließen lassen: Mechanische Manipulationen am Meßsystem, elektrostatische Störungen oder chemische Verunreinigungen der Membranlipide oder des Mediums können zu einer variablen Kurvenform führen. Bei der Interpretation von Membraneffekten können auf diese Weise falsche Ergebnisse entstehen. Allgemein nehmen Kurvenschwankungen und die Steigung der Kurve als Funktion der Zeit ab. Dies zeigt beispielsweise die Kurve in Abb. 2.31. Sie ist ein repräsentatives Beispiel eines Membranleerwerts. Berechnet man die Steigung der Regressionsgeraden im 1., 2., 3. und 4. Viertel der Meßzeit, so erhält man folgende Werte: Die Steigung beträgt im ersten Viertel 0,07, fällt im 2. und 3. Viertel auf 0,02 und im 4. Viertel auf 0,00 ab.

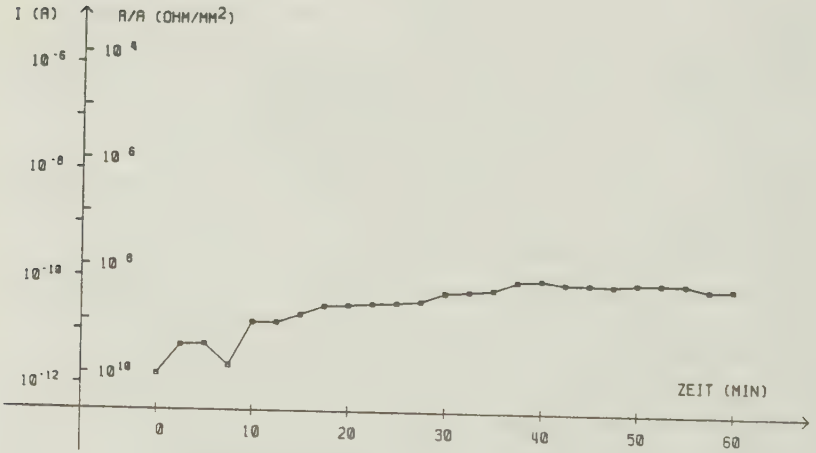


Abb. 2.31 Membranleerwert

Insgesamt werden 119 Leerwertsmessungen durchgeführt. Im statistischen Mittel ergeben sich für fünf Referenzpunkte folgende Werte:

Zeit	log. I	Standardabweichung
00 min.	- 10,94	0,86
15 min.	- 10,55	0,76
30 min.	- 10,36	0,83
45 min.	- 10,23	0,84
60 min.	- 10,15	0,87

Hieraus ergeben sich folgende Steigungen zwischen den Referenzpunkten:

Zeit	Steigung
00 - 15 min.	0,03
15 - 30 min.	0,01
30 - 45 min.	0,01
45 - 60 min.	0,01

Abb. 2.32 zeigt das statistische Mittel aller durchgeführten Membranleerwertsmessungen mit dem entsprechenden 1s-Bereich.

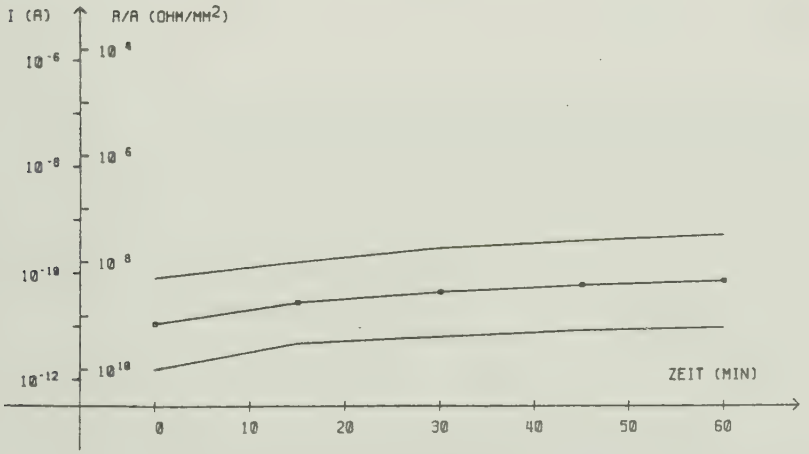


Abb. 2.32 durchschnittlicher MLW mit 1s-Bereich (n = 119)

Auch im statistischen Mittel ist die Steigung der MLW-Kurven am Anfang stärker, d.h. die Membranleitfähigkeit nimmt anfangs schneller zu als in der Folgezeit; der Kurvenverlauf eines

Membranleerwerts entspricht im Idealfall einer asymptotischen Annäherung der Strom-Zeit-Kurve an eine Parallele zur Zeitachse. Der gemessene Strom strebt gegen einen Maximalwert, der sich in verschiedenen Meßreihen unterschiedlich schnell, in der Regel 10 bis 30 min. nach Meßbeginn einstellt. Abb. 2.34 zeigt eine Kurve, die optimalen experimentellen Bedingungen entspricht.

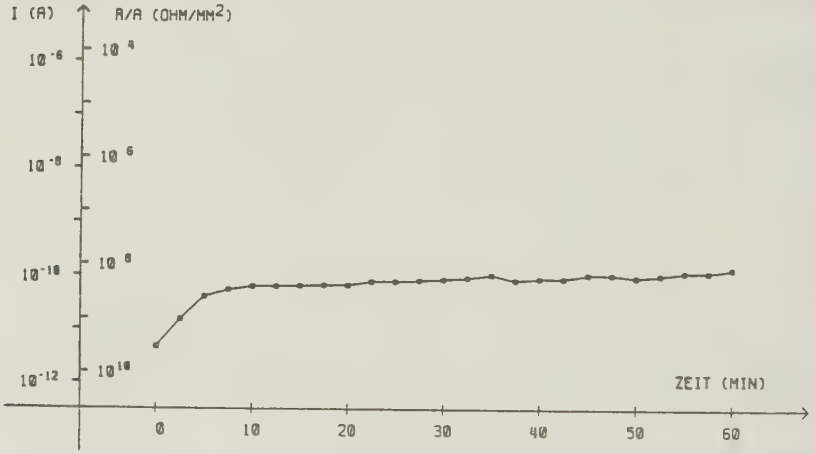


Abb. 2.33 Membranleerwert

Im statistischen Mittel beträgt der 1s-Bereich der Membran nach oben und unten fast eine Zehnerpotenz. Effekte membranaktiver Substanzen, die sich in oder in der Nähe dieses 1s-Bereichs bewegen, besitzen daher nur geringe Aussagekraft. Aus diesem Grunde sind Substanzen, die nur geringe Leitfähigkeitsänderungen an der Membran verursachen, in diesem Meßsystem schlecht zu beurteilen. Falsch negative Ergebnisse sind bei solchen Substanzen nicht sicher auszuschließen.

2.3.2. Beurteilung von Effekten membranaktiver Substanzen an der Lecithinmembran

Aufgrund unserer Meßergebnisse lassen sich die getesteten Substanzen in zwei Gruppen einteilen: Substanzen mit hyperstabilisierender Wirkung und Substanzen mit destabilisierender

Wirkung auf die Membran.

Hyperstabilisierende Substanzen bewirken ein Absinken der Membranleitfähigkeit, die gemessenen Stromwerte liegen unter denen der Leerwert-Kurve. Abb. 2.34 zeigt eine solche Messung, bei der hyperstabilisierende Wirkung aufgetreten ist.

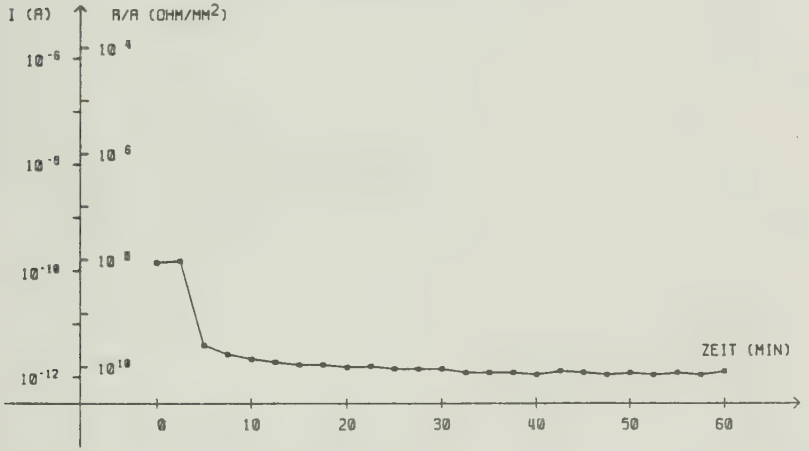


Abb. 2.34 Albumin 0,25 %

Der Begriff 'Hyperstabilisierung' bedeutet, daß durch An- oder Einlagerung dieser Substanzen in die Membran die Permeabilität, d.h. die Durchlässigkeit der Membran für niedermolekulare Substanzen (in unserem System Ionen) weiter abnimmt, die Membran wird quasi 'abgedichtet'. Substanzen, deren WW mit der Membran in einer Anlagerung besteht, kommen auch in vivo vor: In der fluid mosaik membrane sind Proteine (z.B. Enzyme, Strukturproteine), Glykoproteine (z.B. Blutgruppenantigene) u.a. im Membranbilayer zweidimensional beweglich. Neben enzymatischen und strukturellen Aufgaben dieser Nicht-Lipid-Anteile in der Membran haben diese Membranbausteine eine Schutzfunktion, sodaß in vivo die Sensibilität und Störanfälligkeit der Membran gegenüber mechanischen und biochemischen Einflüssen im Vergleich zum BLM-Modell geringer ist. Als weiterer Parameter für Hyperstabilisierung kann ein erhöhtes Zerreißpotential dienen. Zur Messung des Zerreißpotentials wird am Ende der Messung (nach

60 min.) die Spannung an der Membran so weit erhöht, bis es zur Zerstörung der Membran kommt. Die Zerreiß-Spannung ist der hyperstabilisierenden bzw. destabilisierenden Wirkung der Testsubstanz proportional. Hyperstabilisierung konnte bei folgenden Substanzen gemessen werden:

Serumfiltrat 25.000
Albumin (in niedriger Konzentration)
Humankomplement
Trypsin
Zymosan und Komplement

Bei anderen Substanzen stand die Hyperstabilisierung zwar nicht im Vordergrund, konnte aber immerhin bei einzelnen Messungen gezeigt werden:

Humanserum in geringer Konzentration (0,1 %)
Kobravenom 0,01 %
Albumin und Komplement
IgG und Komplement

Destabilisierende Substanzen bewirken ein Ansteigen der Membranleitfähigkeit. Auf molekularer Ebene kann dies entweder als 'membrane disorder' (die Bilayer-Struktur der Membran wird 'durcheinandergebracht') oder als Einbau von Poren in die Membran (kanalbildende Proteine) verstanden werden.

Ist die destabilisierende Wirkung der Substanz sehr ausgeprägt, kommt es zu einer Lyse der Membran noch innerhalb des Meßzeitraums von 60 min. Tritt diese Lyseaktivität einer Testsubstanz auch bei weiterer Verdünnung in ähnlichem Ausmaß auf, sind enzymatische Reaktionen zu vermuten. Diese Überlegung spielt möglicherweise bei der Deutung des Kobravenom-Meßergebnisses eine wichtige Rolle. Kobravenom besitzt neben seiner inhibitorresistenten C3b-Wirkung auch Lysolecithin-Aktivität, die zur enzymatischen Aufspaltung der Lipide führt. Die Meßreihe mit 1 %igem Kobravenom zeigt bei allen Messungen (n = 11) eine Lyse innerhalb der ersten 15 min. Bei den Messungen mit 0,1 %igem Kobravenom erscheinen die Membranen zwar stabiler, die Membranlyse erfolgt später, insbesondere wird nicht bei allen, sondern

nur bei einem Teil der Messungen (bei 11 von 14) eine Lyse beobachtet. Bei dem 0,003 %igen $V_e$rsuchsansatz sollte prinzipiell keine bzw. nur noch eine geringe Lyseaktivität erwartet werden. Es zeigt sich aber, daß immer noch eine erhebliche Aktivität besteht, es werden 3 von 9 Membranen lysiert. Für diese Beobachtungen reicht zur Erklärung eine einfache molekulare Interaktion zwischen Testsubstanz und Membran nicht aus. Vermutlich stehen bei der WW von Kobravenom mit der Lecithinmembran Enzymwirkungen im Vordergrund.

Geringe Destabilisierung der Membran verursacht einen kontinuierlichen Anstieg der Leitfähigkeit (so z.B. beim 'membrane disorder' Phänomen des Zymosans, Abb. 2.35) oder eine pauschale Leitfähigkeitserhöhung (Parallelverschiebung einer 'Leerwertkurve' nach oben), wie sie bei hochgereinigtem humanem IgG (Abb. 2.36) und anderen Kanalbildnern auftritt.

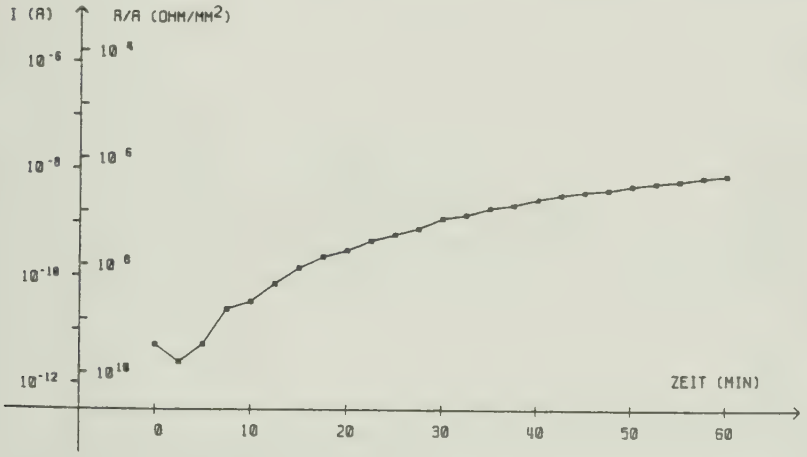


Abb. 2.35 Zymosan

Auch Mischformen kommen vor, sie können als Überlagerung zweier verschiedener Membran-WW-Typen gedeutet werden. Gleichzeitiges Einwirken von IgG und Zymosan führt zu einem Kurvenbild, wie es in Abb. 2.37 dargestellt ist. Im ersten Viertel der Meßzeit dominiert die für IgG typische Kurvenform, nach 15 min. überwiegt ein kontinuierlicher Anstieg der Leitfähigkeit,

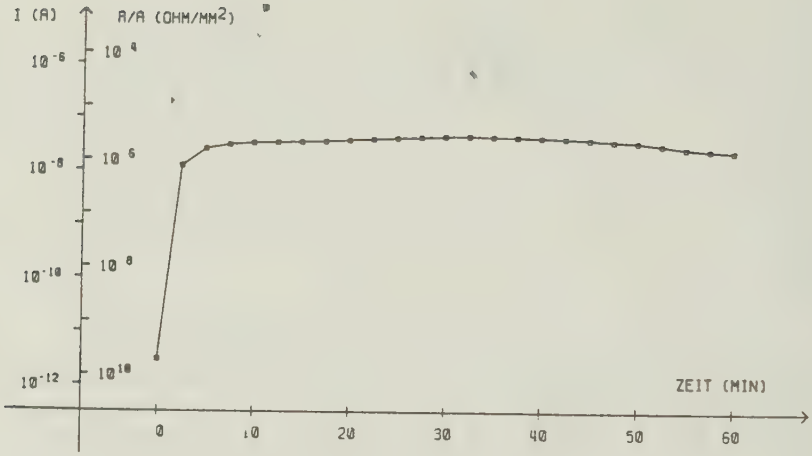


Abb. 2.36 Human IgG

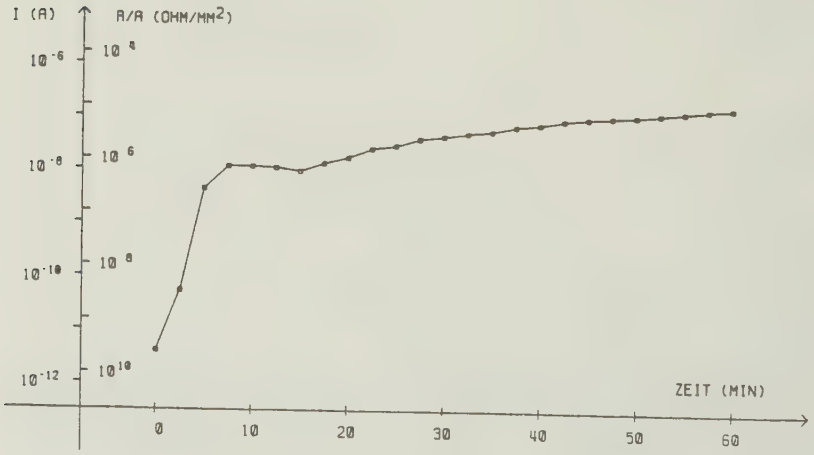


Abb. 2.37 Human IgG und Zymosan

der für Zymosan-WW an der Membran typisch ist.

Die Tatsache, daß sich unterschiedliche Membran-WW-Typen der verschiedenen membranwirksamen Substanzen überlagern, evt. sogar gegenseitig beeinflussen, erklärt die Schwierigkeiten, die sich

bei der Deutung von Wechselwirkungen wie z.B. der Seruminteraktion mit Lecithinmembranen in unserem Modell ergeben. Bei allen Interpretationsansätzen sollte berücksichtigt werden, daß in unserem Modell eine reine Lipidmembran verwendet wird, die schon bezüglich ihrer chemischen Zusammensetzung in der Natur nicht so vorkommt. Mit Sicherheit findet ein beachtlicher Teil der Membranwechselwirkungen mit membranaktiven Substanzen in vivo nicht, nicht nur oder nicht direkt an den Membranlipiden, sondern an Proteinkomponenten der Membran im weitesten Sinne (Rezeptoren) statt. sodaß Effekte, die wir in unserem Meßsystem der BLM beobachten, nur bedingt auf in vivo Verhältnisse übertragbar sind.

Trotzdem wurde beispielsweise der Mechanismus der Komplementaktivierung von verschiedenen Forschungsgruppen anhand des BLM-Modells erforscht. Dies rechtfertigt die Prüfung des BLM-Systems hinsichtlich seiner klinischen Anwendbarkeit als Testsystem zur Diagnostik und Beurteilung von Progredienz und Prognose klinischer Krankheitsbilder, die mit einer Erhöhung membranaktiver Serumbestandteile einhergehen. In diesem Zusammenhang werden in der Literatur z.B. die Spätkomplikationen der Verbrennungskrankheit als Folge zytotoxischer, gegen körpereigene Zellen gerichteter Serumaktivitäten (Verbrennungstoxin) diskutiert. Eine quantitative Bestimmung dieser Serumaktivitäten wäre klinisch für Diagnostik und Prognose der Verbrennungskrankheit von erheblicher Bedeutung.

3. Diskussion

3.1. Auswertung der verschiedenen Meßreihen

3.1.1. Serum

Bevor pathologische Seren (z.B. Serum verbrannter Ratten) auf ihre evt. erhöhte Membranaktivität untersucht werden können, muß zunächst Nativserum in seiner Membranwirkung quantifiziert werden.

3.1.1.1. Nativserum

Verwendung finden lyophilisiertes Meerschweinchenserum (Behring ORAY 196 01604 8670/8), das aufgrund seines hohen Komplementtiters auch in der Routinediagnostik bei der Komplementbindungsreaktion verwendet wird, außerdem natives, frisches Humanserum und Serum nicht verbrannter Ratten als Leerwert für Messungen an Seren verbrannter Ratten.

Meerschweinchen-, Ratten- und Humanserum zeigen bereits bei einer Verdünnung von 1 : 100 (in isotonischem Natrium-Phosphat-Puffer pH 7,4) hohe Membranaktivität, die in 88 % der durchgeführten Messungen zur Destabilisierung und Lyse der Membran führten. Nur sehr wenige Versuche weisen keine Membranlyse auf. Diese Meßreihen führen dann in der Regel zu Kurven, die unterhalb des Membranleerwerts, meist sogar unterhalb des 1s-Bereichs liegen.

Ähnliche Verhältnisse trifft man in Testreihen mit 0,1 %igem Humanserum. Der Anteil der lysierten Membranen ist zwar geringer (50 %), die Meßwerte der nicht lysierten Membranen liegen ebenfalls unterhalb des 1s-Bereichs des Membranleerwerts. Vermutlich sind diese Meßergebnisse Ausdruck eines dosisunabhängigen Reaktionsprinzips. Möglicherweise lagern sich die Serumbestandteile zunächst an die Membran an und führen als Membran - bestandteile primär zu einer Hyperstabilisierung. Bei der Meßreihe mit 0,1 %igem Humanserum verlaufen die Kurven der Messungen, die nicht zur Lyse führen, in der Regel bis kurz vor dem Zeitpunkt

der Membranlyse im oder unterhalb des 1s-Bereichs des MLW. Bis zu diesem Zeitpunkt sind die Kurven, die nicht zur Lyse führen, mit den MLW-Kurven praktisch identisch. Nach dieser Phase der Hyperstabilisierung steigt die Leitfähigkeit der zur Lyse führenden Membranen steil an und es kommt zur Lyse. Möglicherweise gibt es im Serum Komponenten, die sich zunächst an der Membran anlagern, ohne eine lytische Aktivität zu entwickeln, eventuell potentiell lytische Substanzen, die unter bestimmten Umständen (Aktivierung) lytische Aktivität entfalten. Eine weitere Charakterisierung dieses potentiell lytischen Mechanismus ist aufgrund der durchgeführten Messungen nicht möglich.

3.1.1.2. fraktioniertes Serum

In Versuchen mit fraktioniertem Serum kann gezeigt werden, daß eine 1%ige Lösung des Serumfiltrats mit einem Molekulargewicht von weniger als 25.000 bei insgesamt 7 Versuchen in keiner Messung zur Lyse führt. Die Gegenprobe mit 1%iger Lösung von Serumüberstand mit einem Massengewicht von mehr als 25.000 ergibt bei ebenfalls 7 Versuchen eine Lyse bei allen durchgeführten Messungen. Auch die 1%ige Lösung der Serumfraktion mit einem Massengewicht von mehr als 50.000 zeigt lytische Aktivität, die allerdings etwas geringer ist als die Meßreihe mit Serumüberstand (Massengewicht mehr als 25.000). Der Lysezeitpunkt liegt etwas später, in einer von 5 Messungen kommt es nicht zur Lyse.

Membranaktiv sind also Serumbestandteile mit einem Massengewicht von mindestens 25.000. In diese Gruppe fallen z.B. alle gängigen Serumproteine. Das klassische Beispiel eines Serumproteinsystems mit lytischer Aktivität ist das Komplementsystem, dessen Wirkung nebst der Wirkung seiner hochgereinigten Einzelkomponenten auf die BLM untersucht werden soll. Denkbar wäre, daß die potentiell lytische Aktivität des Serums mit der spontanen Aktivierung des Komplementsystems im Meßsystem zusammenhängt. Ob diese Überlegung durch Parallelversuche mit thermisch inaktiviertem Serum experimentell widerlegt werden kann, ist fraglich, da nicht alle Komplementkomponenten thermolabil sind und bereits zirkulierende, aktivierte Komplementkomplexe im BLM-System noch lytische Aktivität entwickeln können, auch wenn in anderen Meßsystemen (z.B. im

klassischen Meßsystem Komplment-Ambozeptor-Hammelerys) keine Aktivität mehr nachweisbar ist.

Selbstverständlich müssen auch andere Serumproteine als Komponenten des Komplementsystems auf ihre Membranaktivität geprüft werden: In dieser Studie werden IgG und Albumin als typische im Serum vorkommende Proteine untersucht.

3.1.2. physiologische Serumbestandteile

3.1.2.1. IgG und Albumin

Als Vertreter weiterer physiologischer Serumbestandteile werden hochgereinigtes Humanalbumin und humanes IgG gewählt: Albumin führt in einer Konzentration, die einer 1 %igen Serumlösung entspricht, zu Effekten an der Lecithinmembran, die unterhalb des MLW liegen. Ein Teil der Meßergebnisse liegt sogar weit jenseits des 1s-Bereichs (Hyperstabilisierung). Bei geringer Erhöhung der Albuminkonzentration lassen sich lytische Aktivitäten zeigen. IgG führt ebenfalls in einer Konzentration, die einer 1 %igen Serumlösung entspricht, zu Strom-Zeit-Kurven, die anfangs in den ersten 10 bis 20 min. steil ansteigen, um dann nahezu konstante Werte anzunehmen. Dieses Kurvenbild läßt auf eine Sättigungskinetik schließen. Erstaunlich ist, daß es ohne Vermittlung von Rezeptoren zu einer reproduzierbaren, direkten Beeinflussung der Membraneigenschaften durch IgG kommt. Es werden Leitfähigkeitserhöhungen um den Faktor 1 : 10 bis 1 : 200 beobachtet.

IgG und Albumin sind somit infolge ihrer Membranaktivität an der Lecithinmembran für die lytischen Aktivitäten, die sich in Versuchen mit 1 %igem Nativserum gezeigt haben, mindestens zum Teil verantwortlich. Wahrscheinlich ist es so, daß eine Vielzahl der Serumproteine gewisse Membranaktivitäten im BLM-System aufweist.

Es zeigt sich, daß das BLM-System gegenüber membranaktiven Stoffen so hochsensibel ist, daß die eigentlich interessierenden Effekte, z.B. die Auswirkungen von im Serum zirkulierenden makromolekularen Komplexen ('membrane attack complex' der terminalen Komplementkomponenten oder das 'Verbrennungstoxin') auf die

Lecithinmembran von unerwünschten Nebeneffekten überlagert werden (Albuminwirkung, IgG-Wirkung).

Es erscheint daher wenig sinnvoll, die Wirkungen eines komplexen Gemischs von Serumkomponenten auf die Lecithinmembran zu untersuchen. Voraussetzung für klare Aussagen über die Membranaktivität ist die Verwendung hochgereinigter Substanzen im BLM-Testsystem, da sonst das Zusammenwirken verschiedener Effekte eine Interpretation der Meßergebnisse erschwert oder sogar unmöglich macht.

3.1.2.2. Humankomplement

Als letzte Serumfraktion wird Komplement (C1-9) hinsichtlich seiner Wirkungen auf die Lecithinmembran untersucht. Experimentell zeigen sich Werte, die in der Regel im 1s-Bereich des MLW liegen und daher keine typische Abweichung von MLW-Messungen erkennen lassen. Insgesamt werden 9 Messungen durchgeführt, in einem Fall kommt es zur Lyse (möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Artefakt), zwei Kurven liegen unterhalb des 1s-Bereichs des MLW.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß es zu keiner spontanen Aktivierung des Komplementsystems gekommen ist, sonst hätten sich aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Systems auch bei der vorgegebenen geringen Komplmentkonzentration Effekte gezeigt.

Das Komplementsystem ist ein kaskadenförmig ablaufendes, hochwirksames Abwehrsystem mit zytotoxischen Eigenschaften, die gegen membranartige Strukturen gerichtet sind. In vivo erfolgt die Komplementaktivierung antikörpervermittelt über den klassischen Weg bzw. über eine Rückkopplungsveränderung über den alternativen Weg. Unter pathologischen Voraussetzungen kann es unter bestimmten Bedingungen im Organismus zu Komplementaktivierung kommen, die nicht gegen körperfremdes Material, sondern auch gegen körpereigene Zellen gerichtet ist. Das Verbrennungstoxin besitzt ebenfalls solche gegen körpereigene Zellen gerichtete Aktivität, die möglicherweise z.T. auf eine thermisch bedingte Fehlaktivierung des Komplementsystems zurückzuführen ist und in Form von hochreaktiven (? Komplement-) Komplexen, die nach einer Latenzzeit in den Kreislauf eingeschwemmt werden, die Spätfolgen der Verbrennungs-

krankheit und den Verbrennungstod verursachen.

Aufgrund unserer in-vitro Messungen konnte eine Spontanaktivierung des Komplements im BLM-System ausgeschlossen werden. Zunächst soll Komplement in unserem Meßsystem experimentell aktiviert werden. Folgende Stoffe werden als Komplementaktivatoren Zymosan, IgG, Trypsin, Albumin. Zunächst werden die Einzelwirkungen an der Lecithinmembran, anschließend die WW der Stoffe untereinander und in Verbindung mit Komplement an der Lecithinmembran untersucht.

3.1.3. in vitro Aktivierung des Komplementsystems

3.1.3.1. Trypsin

Trypsin ist eine Proteinase, die als Trypsin-Vorstufe (Trypsinogen) vom Pankreas sezerniert wird und im Dünndarm durch Abspaltung eines Hexapeptids in die aktive Form übergeht. Die relative Molekülmasse beträgt 24.000, Trypsin entwickelt im schwach alkalischen Medium seine optimale proteolytische Aktivität. Trypsin wirkt nicht spezifisch auf bestimmte Proteine , aber es besitzt für bestimmte Lysyl- und Arginylverbindungen im Proteinmolekül eine ausgeprägte Hydrolyseaktivität.

Auch Komplementkomponenten werden durch Trypsin gespalten. Die entstehenden Komplementspaltprodukte vermögen das Komplementsystem auf der Stufe der C5-Aktivierung durch C3-Spaltprodukte zu aktivieren.

Ein Nachteil der Komplmentaktivierung durch Trypsin besteht darin, daß Trypsin im Blutkreislauf durch dort vorkommende Proteinaseinhibitoren ausgeschaltet wird. In diesen Meßreihen werden deshalb hochgereinigte humane Komplement-Fraktionen verwendet.

Zunächst werden Komplement und Trypsin jeweils für sich auf Effekte an der Membran untersucht (Abb. 3.1). Bei beiden Meßreihen zeigt sich in der Regel keine lytische Aktivität. Jeweils 8 von 9 Messungen führen nicht zur Lyse, sondern zur Hyperstabilisierung der Membran. Nach 60 min. wird bei Trypsin eine Leitfähigkeitserniedrigung um den Faktor 3,2 : 1 beobachtet. Bei Komplement

beträgt der entsprechende Faktor 1,8 : 1. Komplement und Trypsin - jeweils für sich getestet - führen also nicht zur Lyse der Membranen, sondern zu einer Membraninteraktion im Sinne einer Hyperstabilisierung (die Leitfähigkeit ist im Vergleich zum MLW erniedrigt). Die Tatsache, daß es in jeweils einer von 9 Messungen zur Lyse der Membran sowohl bei Trypsin, als auch bei der Komplement-Meßserie kommt, kann durch Artefakte bedingt sein (z.B. mechanische oder elektrostatische Alterationen). Bei Komplement ist eine unkontrollierbare Aktivierung nicht mit Sicherheit auszuschließen. Trotzdem kann aufgrund des überwiegenden Anteils der Meßergebnisse, die nicht durch lytische Aktivität gekennzeichnet sind, eine primär lytische Aktivität der beiden getesteten Substanzen Trypsin und Komplement ausgeschlossen werden.

In der folgenden Meßserie ist sowohl Komplement als auch Trypsin (als Komplementaktivator) im wässrigen Medium gleichzeitig vorhanden. Theoretisch müßte es nun zur Komplementaktivierung kommen, die sich zumindest in einer Erhöhung der Leitfähigkeit, wenn nicht

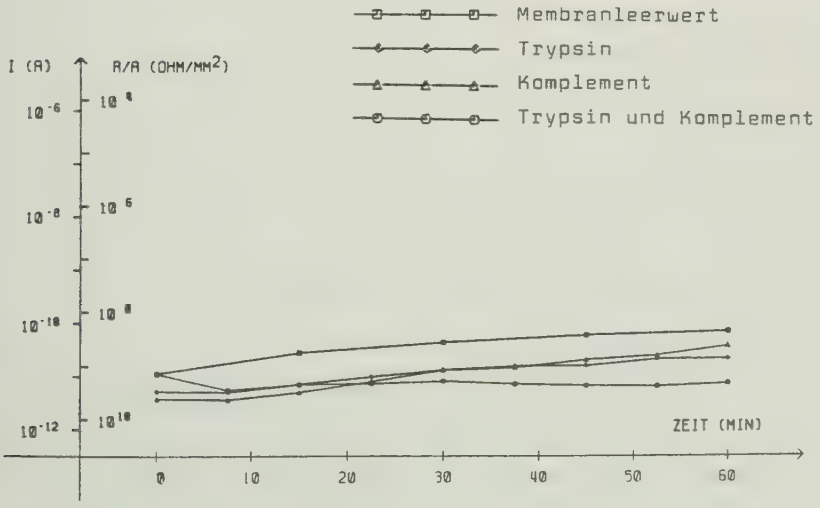


Abb. 3.1 in vitro Aktivierung vonKKomplement durch Trypsin

in der Entwicklung von lytischen Aktivitäten äußert. Experimentell findet sich in 5 von 9 Messungen Membranlyse, die 4 übrigen Messungen zeigen Hyperstabilisierung (der nach 60 min. erreichte Wert liegt hier um den Faktor 9,3 : 1 unterhalb des MLW und auch unter den Werten der Trypsin- und Komplement-Einzelmessungen). Es tritt also entweder eine lytische Aktivität auf, die sich nicht durch Addition der möglicherweise artefaktbedingten Lyserate der Komplement- bzw. Trypsin-Einzelmessungen erklären läßt (dies spricht für eine Aktivierung der Komplementkaskade durch Trypsin), oder es kommt zur Hyperstabilisierung: Auch hier kann eine überadditive Wirkung der Einzeleffekte beobachtet werden: Die Trypsin- und Komplementmoleküle ergänzen sich in ihrer membranabdichtenden Funktion. Denkbar ist, daß sich in diesen Meßreihen Komplement zwar an die Membran anlagert, daß es aber nicht aktiviert wird und es weder zur Erhöhung der Leitfähigkeit noch zur Lyse, sondern durch Anlagerung an die Membran zur Hyperstabilisierung kommt.

Es kann also von einer in vitro Aktivierung des Komplementsystems ausgegangen werden, wobei die Messungen nicht in so hohem Maße reproduzierbar sind, daß sich das Verfahren als Test in der Routinelabordiagnostik bezüglich der Quantifizierung membranwirksamer Substanzen eignen könnte. Außerdem wäre, wie schon erwähnt, eine hohe Reinigung der entsprechenden Anteile aus Patientenserum erforderlich. Da dies mit einem erheblichen methodischen Aufwand verbunden ist und bei der Reinigung der Testseren möglicherweise Membranaktivität verloren geht bzw. verändert wird, ist das beschriebene Verfahren, bei dem die Komplementaktivierung durch Trypsin erfolgt, mit Sicherheit so nicht in der Routinediagnostik anwendbar.

3.1.3.2. Untersuchung einer AGAK-vermittelten Komplementaktivierung in vitro

Die Komplementaktivierung über den klassischen Weg erfolgt durch eine AGAK-Reaktion. In vitro wurde Zymosan als AG und humanes IgG als AK verwendet. Die Komplementfaktoren liegen als hochgereinigte Einzelkomponenten vor.

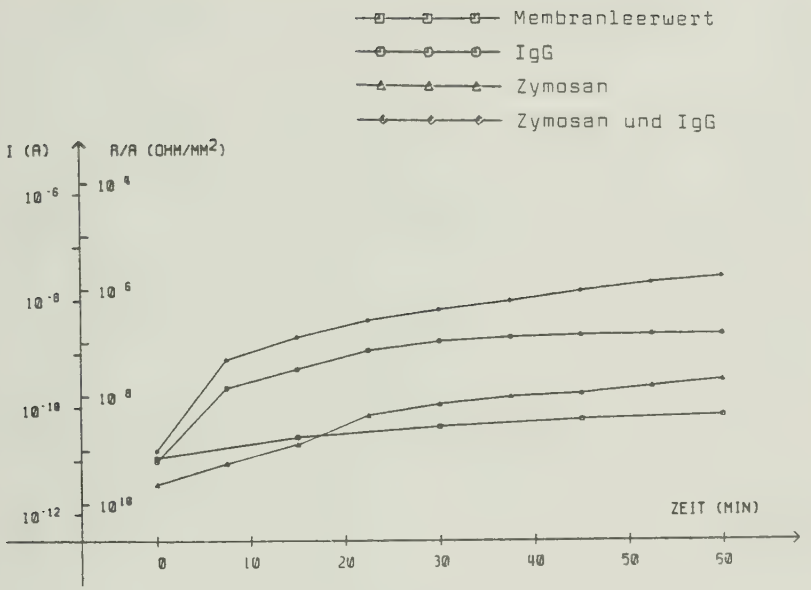


Abb. 3.2 Untersuchung der Eigenaktivitäten von IgG, Zymosan, IgG + Zymosan

Zymosan und IgG zeigen jeweils für sich schon eine gewisse Membranaktivität (Abb. 3.2). Zwar werden die Membranen in der Regel nicht lysiert, doch sind im Vergleich zum MLW die gemessenen Stromwerte deutlich erhöht. Am Ende der Messungen (nach 60 min.) zeigt Zymosan eine auf den MLW bezogene, durchschnittliche Leitfähigkeitserhöhung von 1 : 4,7. Für IgG beträgt dieser Faktor 1 : 34 .

Läßt man Zymosan und IgG gleichzeitig auf Lecithinmembranen einwirken (Abb. 3.2), erhöht sich die Lyserate im Vergleich zu den Einzelmeßserien mit IgG und Zymosan. Die nicht lysierten Membranen zeigen nach 60 min. eine durchschnittlich 410-fache Erhöhung der Leitfähigkeit. Die Einzelwirkungen von Zymosan und IgG haben sich potenziert. AGAK-Komplexe zeigen offensichtlich bezüglich der Leitfähigkeitsänderung an der Lecithinmembran eine ganz erhebliche Aktivität, die sich nicht allein

durch die Summe der Einzelwirkungen von AG und AK an der Lecithinmembran (hier durch Zymosan und IgG repräsentiert) erklären läßt.

Fügt man diesem System, das bis jetzt aus AG und AK besteht, Komplement hinzu (Abb. 3.3) - das Komplementsystem ist der lytische Effektorarm einer abgelaufenen AGAK-Reaktion - müßte eine weitere, diesmal drastische Steigerung der Lyserate (prozentualer Anteil der lysierten Membranen an der Gesamtzahl der Messungen einer Serie) und eine Erhöhung der Leitfähigkeit der nicht lysierten Membranen als Ausdruck einer gegen die Membran gerichteten Komplementaktivität eintreten.

Experimentell läßt sich eine Steigerung der Lyserate erzielen, 3 von 7 Messungen führen zur Lyse (bei der Zymosan-IgG-Meßreihe führen 3 von 11 Versuchsansätzen zur Lyse). Die Leitfähigkeit der nicht lysierten Membranen ist um den Faktor 1 : 2,6 gegenüber dem MLW erhöht.

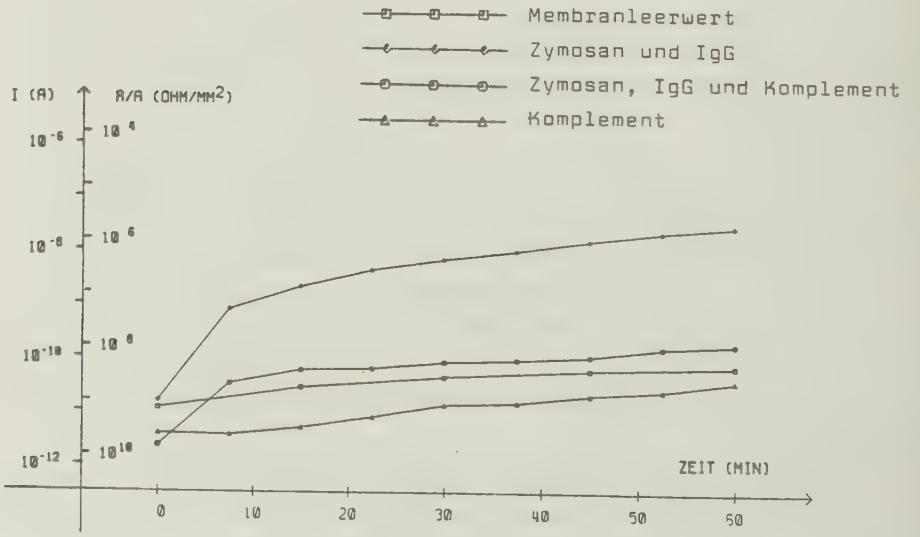


Abb. 3.3 in vitro Aktivierung der Komplementkaskade durch AGAK-Komplexe

Aus diesen experimentellen Befunden ergeben sich folgende Konsequenzen: Das System Zymosan-IgG-Komplement müßte im Falle einer Aktivierung des Komplementsystems zu einer Lyse der Membran oder zumindest zu einer signifikanten Erhöhung der Leitfähigkeit der Membran führen. Dies kann jedoch experimentell nicht in dem erwarteten Ausmaß bestätigt werden. Das System Zymosan-IgG-Komplement weist absolut und im Vergleich zu den Systemen Zymosan-IgG und IgG zu geringe Leitfähigkeit auf.

Es scheint, als wäre die Leitfähigkeitserhöhung, wie sie in den Meßserien 'IgG', 'Zymosan' und 'IgG und Zymosan' beobachtet werden kann, durch Zusatz von Komplement praktisch aufgehoben. Analoge Beobachtungen können auch in den Meßreihen 'IgG und Komplement' (Abb. 3.5) und 'Zymosan und Komplement' (Abb. 3.4) gemacht werden.

Läßt man Zymosan und Komplement gleichzeitig auf Lecithinmembranen einwirken, kann im Vergleich zu Zymosan-Einzelmessungen gezeigt werden, daß auch hier durch Komplement zwar die Lyserate geringfügig erhöht ist, die Leitfähigkeit der nicht lysierten Membranen jedoch um den Faktor 18 : 1 (bezogen

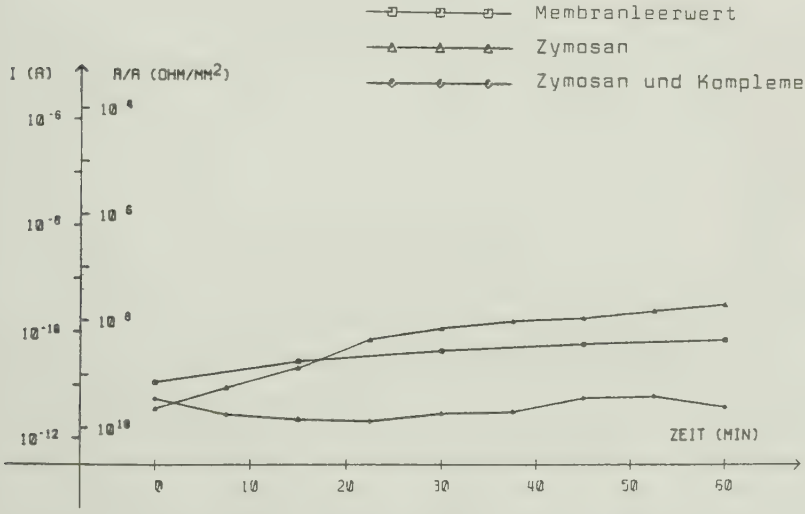


Abb. 3.4 Zymosan-Komplement-WW an der Lecithinmembran

auf den 60 min. Wert des MLW) erniedrigt ist. Hier wird also die Zymosan-WW an der Membran durch Komplement quasi aufgehoben. Darüber hinaus tritt eine Hyperstabilisierung der Membran ein. (Abb. 3.4)

Derselbe Effekt läßt sich für IgG und Komplement zeigen. Die Lyserate ist im Vergleich zur Meßreihe IgG leicht erhöht, die Membranaktivität bei Messungen, die keine Lyse aufweisen, ist auch hier deutlich herabgesetzt. Es tritt eine Leitfähigkeitserniedrigung um den Faktor 1,6 : 1 auf (Abb. 3.5).

Aus diesen experimentellen Ergebnissen muß geschlossen werden, daß Komplement, sofern es nicht aktiviert wird und zur Lyse der Membran führt, die WW von Zymosan und / oder IgG mit der Membran vermindert oder aufhebt, quasi die Membran vor dem Zugriff durch AG, AK bzw. AGAK-Komplexe schützt, möglicherweise durch Anlagerung der (nicht aktivierten) Komplementproteine an die Membran. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, daß Komplement zirkulierende AG, AK oder AGAK-Komplexe dahingehend modifiziert, daß die potentielle Möglichkeit zur Membran-WW

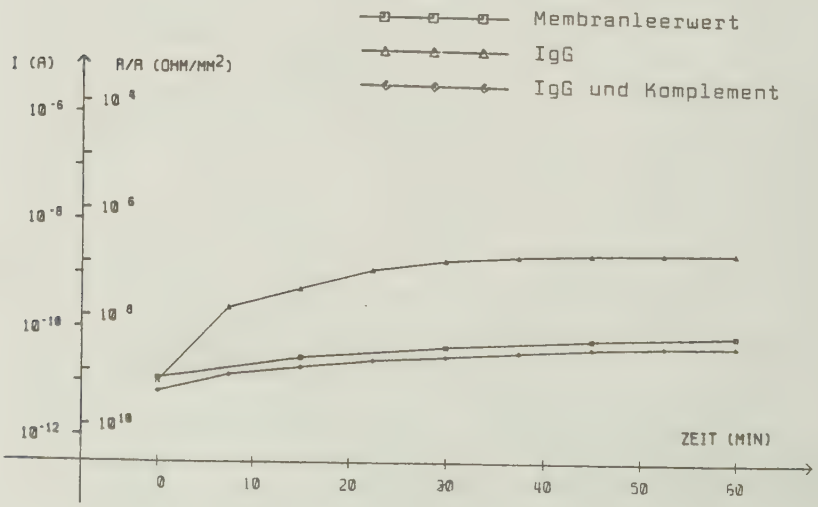


Abb. 3.5 IgG-Komplement-WW an der Lecithinmembran

eingeschränkt oder aufgehoben wird. Als dritte Erklärungsmöglichkeit wäre denkbar, daß Komplement zwar aktiviert wird, daß der Aktivierungsvorgang jedoch nicht oder nicht regelmäßig in der Nähe der Membran abläuft, sondern im flüssigen Medium durch zirkulierende AG, AK oder AGAK-Komplexe initiiert wird. In diesem Fall würde die Komplementaktivität verpuffen, ohne daß eine Membraninteraktion hätte eintreten können.

3.1.3.3. Albumininduzierte Komplementaktivierung

Aufgrund der bisher durchgeführten Meßreihen muß bei der Beurteilung von Serumeffekten an der Membran berücksichtigt werden, daß die Eigenschaften der BLM (z.B. chemische Zusammensetzung) nicht mit in vivo Verhältnissen vergleichbar sind. Die Ergebnisse, die im BLM-SYstem gewonnen werden, sind daher hinsichtlich ihrer Analogie zu in vivo Bedingungen kritisch zu beurteilen.

Es kann gezeigt werden, daß Albumin an sich schon erhebliche,

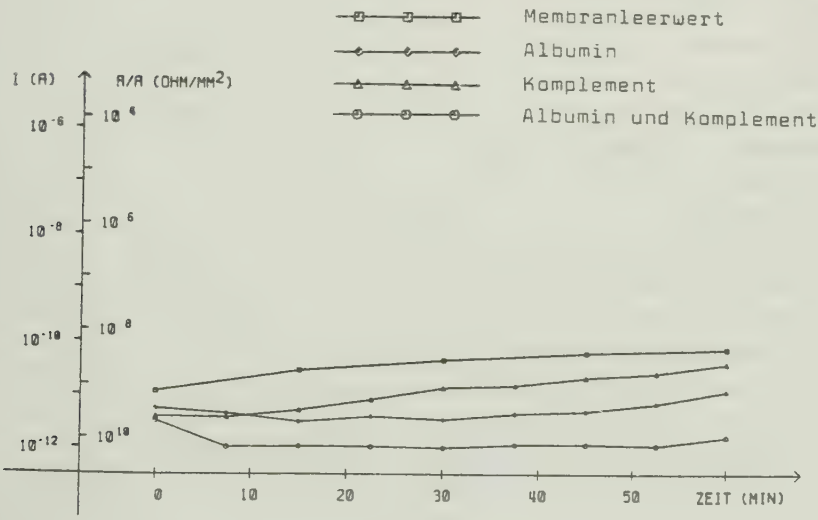


Abb. 3.6 Albumin-Komplement-WW an der Lecithinmembran

konzentrationsabhängige WW mit der BLM zeigt. Eine Albuminkonzentration, die einer 1 %igen Serumlösung entspricht, entwickelt noch keine lytische Aktivität an der BLM. Im Durchschnitt kommt es nach 60 min. zu einer Leitfähigkeitserniedrigung um den Faktor 6,2 : 1 (Abb. 3.6). Die Lyserate ist = 0.

In der Komplementmeßserie wird neben einer geringen lytischen Aktivität (in einer von 9 Messungen trat Lyse ein) in der Regel eine Hyperstabilisierung der Membran beobachtet. Im Durchschnitt tritt nach 60 min. eine geringe Leitfähigkeitserniedrigung um den Faktor 1,8 : 1 auf (Abb. 3.6).

Betrachtet man die Messungen, bei denen Albumin und Komplement im Medium vorgegeben sind, zeigt sich folgendes: In 3 von 9 Messungen erfolgt Lyse der Membran, die übrigen, nicht lysierten Membranen zeigen eine im Vergleich zu allen anderen Meßreihen maximale Stabilisierung wie sie bei keiner anderen Meßserie beobachtet wird. Es tritt eine Leitfähigkeitserniedrigung der Membran um den Faktor 44 : 1 ein (Abb. 3.6). Dies weist auf eine durch Albumin induzierbare Komplementaktivierung unter in vitro Bedingungen unseres Meßsystems (BLM) hin. Die extreme Leitfähigkeitserniedrigung der nicht lysierten Membranen zeigt, daß es zwar bei diesen Messungen zwar zu einer WW mit der Membran durch Anlagerung des Albumins und der Komplementkomponenten und der damit verbundenen Hyperstabilisierung kommt, daß aber eine Aktivierung der an die Membran angelagerten Substanzen bei diesen Meßreihen nicht erfolgt. Diese Betrachtungsweise spricht für einen 'tick-over'-Mechanismus: Die Aktivierung des Systems tritt schlagartig nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip ein. Es kommt nicht zu einer definierten Leitfähigkeitserhöhung der Membran, sondern entweder zu einer Stabilisierung der Membran oder zur Lyse. Angesteuert wird das 'tick-over' in dieser Meßreihe durch Albumin. Diese durch Albumin provozierbare Aktivierung eines lytischen Systems ist in vivo nur schlecht oder gar nicht vorstellbar. Unter physiologischen Bedingungen kann klinisch nicht davon ausgegangen werden, daß Albumin Komplement aktiviert.

3.2. Allgemeine Beurteilung, Zusammenfassung

Die Unterschiede zwischen in vitro Betrachtungen und in vivo Verhältnissen zeigen, daß die Übertragung von in unserem BLM-Modell gewonnenen Ergebnissen auf in vivo Bedingungen nicht ohne weiteres möglich ist. Im BLM-Modell liegt eine Membran vor, die aus einer reinen Lecithinfraktion besteht. Im Unterschied dazu haben biologische Membranen einen wesentlich komplexeren Aufbau: Neben einer Vielzahl verschiedener Lipide haben auch Protein- und KH-Anteile in der Membran wichtige Aufgaben als Strukturproteine. Diese Bestandteile der Membran sind das Korrelat gewisser an die Membran gekoppelter Stoffwechselleistungen. Die biologsiche Funktion der Membran läßt sich in der BLM nicht nachvollziehen. Wesentliche Membraneigenschaften sind daher in unserem Modell nicht berücksichtigt.

Möglicherweise ist eine reine Lecithinmembran, wie wir sie verwendet haben, aufgrund ihrer mangelhaften funktionellen Leistungen gegenüber potentiell membranaktiven Agentien vulnerabler als biologische Membranen: Unter in vivo Bedingungen ist eine albumininduzierte Komplementaktivierung nicht denkbar. Dasselbe trifft mit Sicherheit auch für andere Substanzen zu. Möglicherweise setzen Proteine und andere Stoffe als Membranbestandteile die WW-Bereitschaft mit potentiell membranaktiven Substanzen erheblich herab. Diese Überlegungen relativieren die Signifikanz der im BLM-Modell gewonnenen Ergebnisse. Neben der Frage, ob die im BLM-System gewonnenen in vitro Ergebnisse überhaupt auf klinische Fragestellungen übertragbare Aussagen erlaubt, ergeben sich bezüglich Methodik und Interpretation der in diesem Meßverfahren gewonnenen Ergebnisse folgende prinzipiellen Probleme: Das in der klinischen Anwendung des BLM-Modells hauptsächlich interessierende Untersuchungsmaterial ist primär Serum. Serum enthält eine Vielzahl von potentiell membranaktiven Substanzen, die sich bei der Beurteilung des Aktivierungsniveaus des Komplementsystems als eigentlich interessierendes System störend bemerkbar machen. Eine isolierte Betrachtung aktivierter Komplementkomplexe wäre daher erst nach einer entsprechenden Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials sinnvoll, wobei alle an der BLM potentiell aktiven Serumbestand-

teile eliminiert werden müßten. Dies erfordert einen ganz erheblichen Aufwand, der sich im Rahmen eines routinemäßigen Labortests sicher nicht vertreten läßt.

4. Anhang

Es folgt eine Zusammenstellung der Meßergebnisse. Dargestellt werden die statistischen Mittelwerte für 9 Referenzpunkte innerhalb des 60 min. Meßzyklus und die entsprechenden 1s-Bereiche.

Lyserate bedeutet die Anzahl der lysierten Membranen im Verhältnis zur Gesamtzahl der durchgeführten Versuche einer Meßserie.

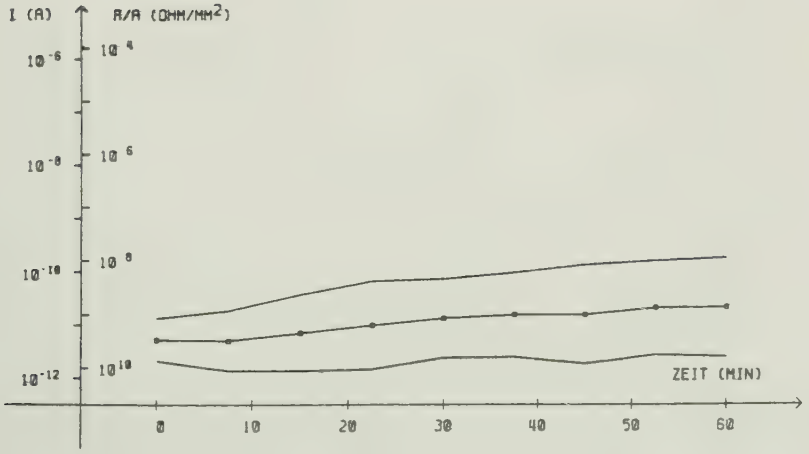


Abb. 4.1 Trypsin; Lyserate 11 % (n = 9)

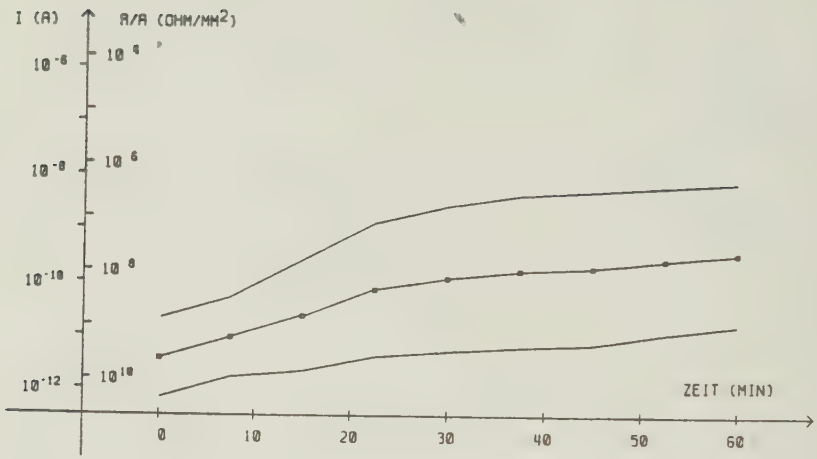


Abb. 4.2 Zymosan; Lyserate 9 % (n = 11)

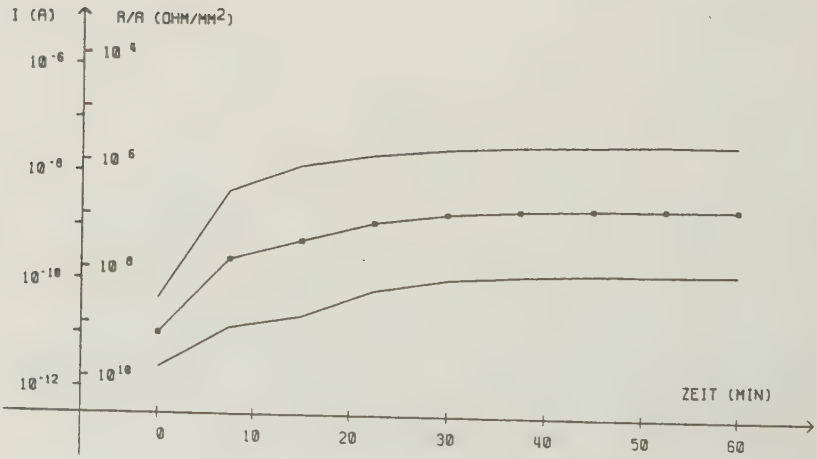


Abb. 4.3 IgG; Lyserate 9 % (n = 11)

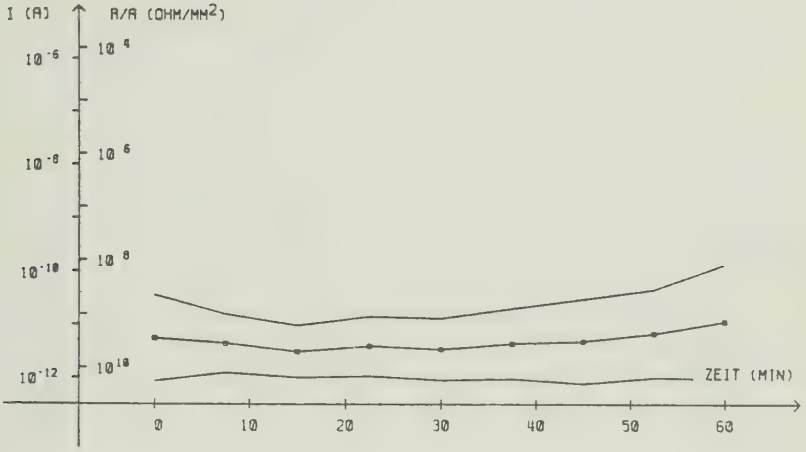


Abb. 4.4 Albumin; Lyserate 0 % (n = 7)

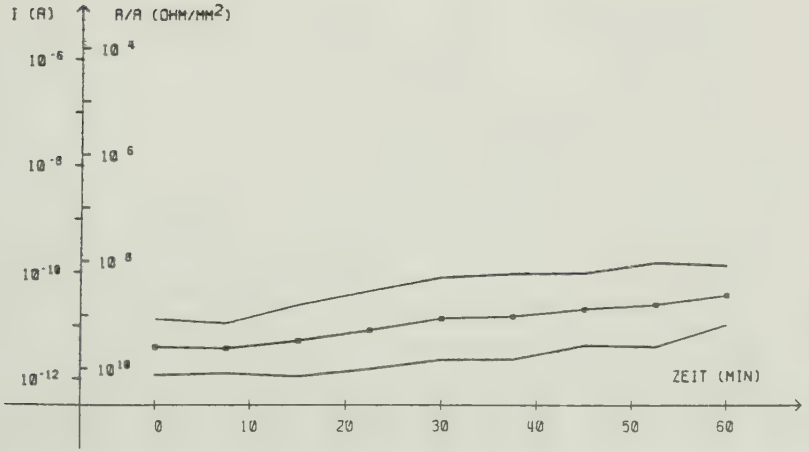


Abb. 4.5 Komplement; Lyserate 11 % (n = 9)

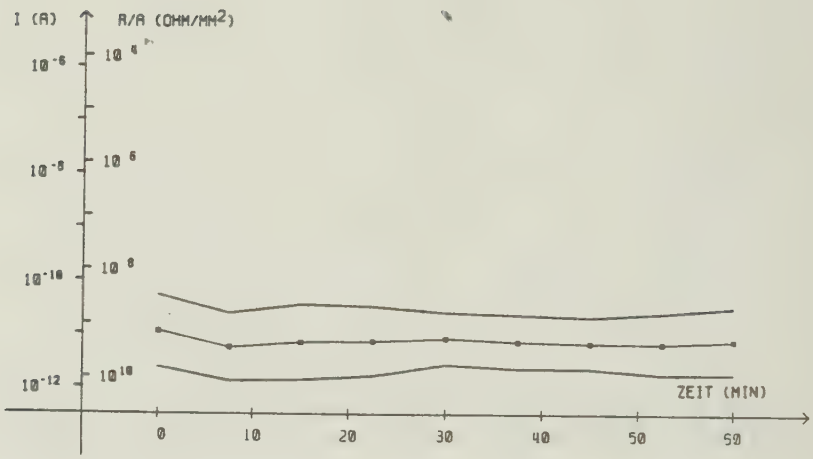


Abb. 4.6 Trypsin und Komplement; Lyserate 56 % (n = 9)

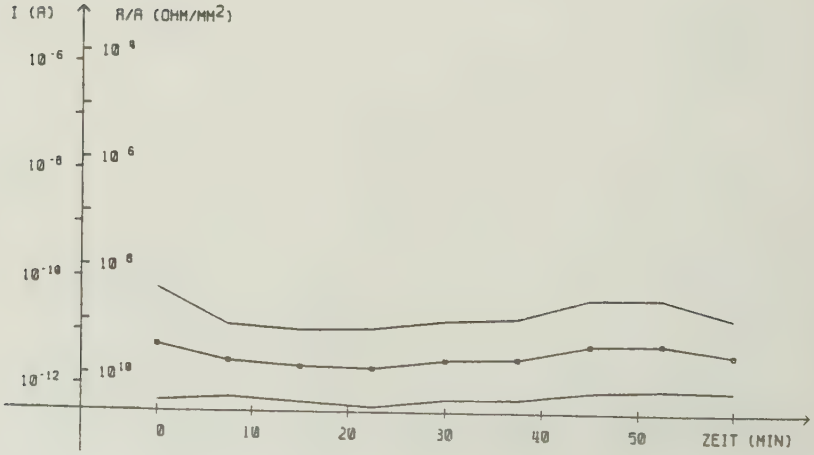


Abb. 4.7 Zymosan und Komplement; Lyserate 33 % (n = 6)

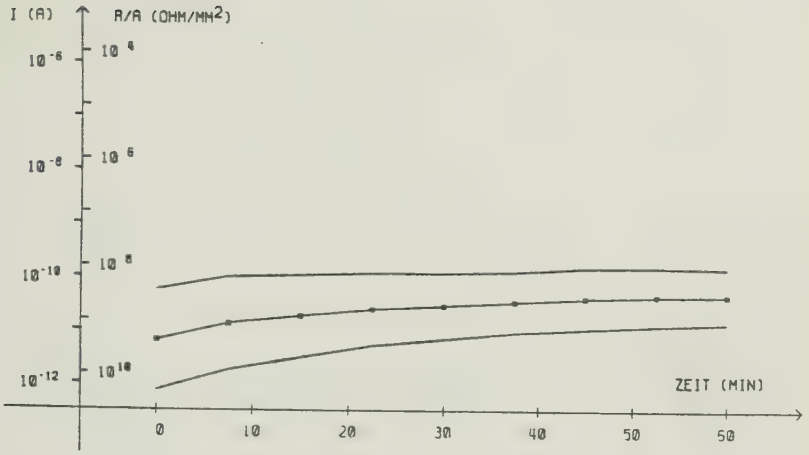


Abb. 4.8 IgG und Komplement; Lyserate 17 % (n = 6)

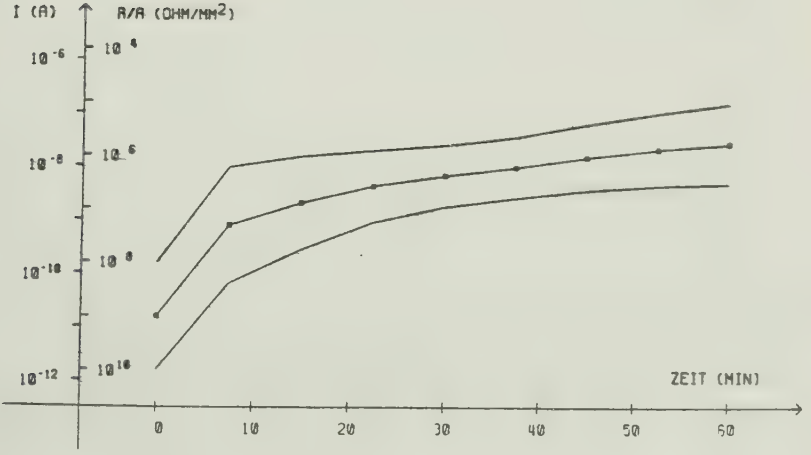


Abb. 4.9 Zymosan und IgG; Lyserate 33 % (n = 11)

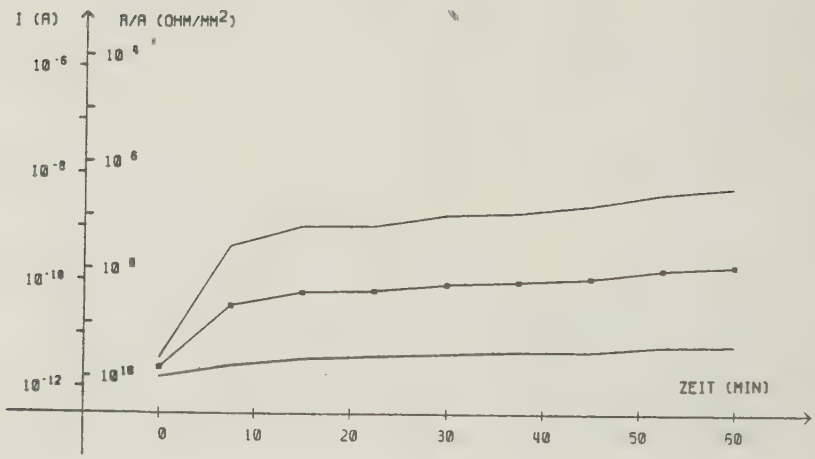


Abb. 4.10 IgG, Zymosan und Komplement; Lyserate 43 % (n = 7)

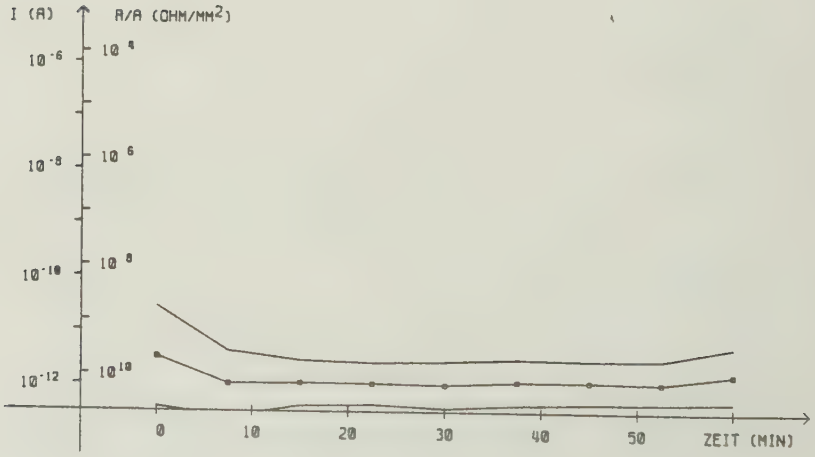


Abb. 4.11 Albumin und Komplement; Lyserate 33 % (n = 9)

5. Literatur

(1) Abstracts of Papers presented at the 8. International Complement Workshop, Key Biscayne, Florida, October 13 - 16, 1979
J. Immunology 124 (3) 1980 1512 - 1547

(2) Bachmann, K.: Biologie für Mediziner
Springer Verlag Heidelberg 1976

(3) Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J.: Molecular Nature of the Complement Lesion
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 (11) 1978 5655 - 5659

(4) Bhakdi, S., Tranum-Jensen, J.: Re-Incorporation of the Terminal C5b-9 Complement Complex into Lipid Bilayers: Formation and Stability of reconstituted Liposomes
Immunology 41 1980 737 - 742

(5) Bier, O.G., Götze, D., Mota, I., da Silva, W.D.: Experimentelle und klinische Immunologie
Springer Verlag Berlin Heidelberg 1979

(6) Boyle, M.D.P., Borsons, T.: Studies on the Terminal Stages of Immune Hemolysis, V. Evidence that not all Complement-produced Transmembrane Channels are equal
J. Immunology 123 (1) 1979 71 - 76

(7) Boyle, M.D.P., Gee, A.P., Borsos, T.: Studies on the Terminal Stages of Immune Hemolysis, VI. Osmotic Blockers of Differing Stokes' Radii Detect Complement-induced Transmembrane Channels of differing Size
J. Immunology 123 (1) 1979 77 - 82

(8) Boyle, M.D.P., Borsos, T.: Review Article, The Terminal Stages of Immune Hemolysis - A Brief Review
Mol. Immunol. 17 1980 425 - 432

(9) Brade, V.: Komplement, Funktion, biologische Bedeutung und klinische Aspekte
Münch. Med. Wschr. 121 (46) 1979 1521 - 1526

(10) Bucher, O.: Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen 10. Auflage
Verlag Hans Huber Bern Stuttgart Wien 1980

(11) Capel, P.J.A., Goeneboer, O., Grosveld, G., Pondman, K.W.: The Bindung of activated C3 to Polysaccharides and Immunoglobins
J. Immunology 121 (6) 1978 2566 - 2572

(12) Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S.: Microbiology, 3. Auflage Harper International Edition 1980

(13) Esser, A.F., Kolb, W.P., Podack, E.R., Müller-Eberhard, H.J.: Molecular Reorganisation of Lipid Bilayers by Complement: A possible Mechanism for Membranolysis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (3) 1979 1410 - 1414

(14) Hadding, U.: Aufbau und Leistung des Immunsystems
Deutscher Apotheker Verlag Pharmazie Heute 2 12/78 1/79

(15) Golub, E.S.: Die Immunantwort
Springer Verlag Berlin Heidelberg 1982

(16) Hammer, C.H., Shin, M.L., Mayer, M.M.: On the Mechanism Of Cytolysis by Complement: Evidence of an Insertion of C5b and C7 Subunits of the C5b,6,7 Complex into Phospholipid Bilayers of Erythrocyte Membranes
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 (12) 1975 5076 - 5080

(17) Hammer, C.H., Shin, M.L., Abramovitz, A.S. Mayer, M.M.: On the Mechanism of Cell Membrane Damage by Complement: Evidence on Insertion of Polypeptide Chains from C8 and C9 into the Lipid Bilayer of Erythrocytes
J. Immunology 119 (1) 1977 1 - 8

(18) Jain, M.K.: The Bimolecular Lipid Membrane: A System
Van Nostrand Reinhold Company New York 1972

(19) Jain, M.K., Wagner, R.C.: Introduction to Biological Membranes
A Wiley Interscience Publication John Wiley and Sons New York 1980

(20) Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler 11. Auflage
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1980

(21) Keller, R.: Immunologie und Immunpathologie
Georg Thieme Verlag 1981

(22) Lachmann, P.J., Halbwachs, L.: The Influence of C3b Inactivator (KAF) Concentration on the Ability of Serum to Support Complement Activation
Clin. Exp. Immunol. 21 1975 109 - 114

(23) Lachmann, P.J.: Complement
The Antigens V 1979 Academic Press Inc. 283 - 353

(24) Lachmann, P.J.: Überlegungen zur Evolution des Komplementsystems
Behring Inst. Mitt. 63 1979 41 - 54

(25) Mayer, M.M.: An International Symposium on 'The Nature and Significance of Complement Activation'
Symposiums-Schrift 1976 29 - 41
On the Mechanism of cytolysis by Complement: Experimental Studies of the Transmembrane Channel Hypothesis

(26) Mayer, M.M.: Complement, Past and Present
The Harvey Lectures 72 1978 139 - 193
Academic Press Inc. New York

(27) Mayer, M.M., Hammer, C.H., Michaels, D.W., Shin, M.L.: Immunologically mediated Membrane Damage: The Mechanism of Complement Action and the Similarity of Lymphocyte-mediated Cytotoxicity
Immunochemistry 15 1979 813 - 831

(28) Mayer, M.M.: Transmembrane Channels produced by Complement Proteins
Ann. NY Acad. Sci. 358 1980 43 - 53

(29) Mayer, M.M.: Membrane Damage by Complement
The John Hopkin's Medical Journal 148 1981 243 - 258

(30) Michaels, D.M., Abramovitz, A.S., Hammer, C.H., Mayer, M.M.: Increased Ion Permeability of Planar Lipid Bilayer Membranes after Treatment with the C5b-9 Cytolytic Attack Mechnism of Complement
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 (8) 1976 2852 - 2856

(31) Nicol, P.A.E., Lachmann, P.J.: The Alternative Pathway of Complement Activation, The Role of C3 and its Inactivator (KAF)
Immunology 24 1973 259 - 275

(32) Ricken, K.H.: Taschenatlas der Immunologie, Allergie und allgemeinen Infektionslehre
Verlag für Medizin Dr. Ewald Fischer Heidelberg 1981

(33) Roitt, I.: Essential Immunology
Blackwell Scientific Publications 4. Auflage 1980
Oxford London Edinburgh Boston Melbourne

(34) Ramm, L.E., Mayer, M.M.: Life-span and Size of the Transmembrane Channel formed by large Doses of Complement
J. Immunology 124 (5) 1980 2281 - 2287

(35) Sandoz: Das Komplementsystem, Eine Informationsreihe 1980

(36) Schön, K., Koeppe, H.W.: Unspezifische Immunmechanismen
Med. Klinik 74 1979 461 - 469 Nr. 13

(37) Schorlemmer, H.U.: Das Komplement-System, Die gelben Hefte, Immunbiologische Informationen E.v. Behring 2/1982 49 - 59

(38) Scott, D.M., Amos, N., Sissons, J.G.P., Lachmann, P.J., Peters, D.K.: The Immunglobin Nature of Nephritic Factor (NeF)
Clin. Exp. Immunol. 32 1978 12 - 24

(39) Shin, M.L., Paznekas, W.A., Abramovitz, A.S., Mayer, M.M.: On the Mechanism of Membrane Damage by Complement: Exposure of Hydrophobic Sites on activated Complement Proteins
J. Immunology 119 (4) 1977, 1358 - 1364

(40) Silbernagl, S., Despopoulos, A.: Taschenatlas der Physiologie 1979 Georg Thieme Verlag Stuttgart

(41) Yamamoto, K., Gewurz, H.: The Comolex of C5b and C6: Isolation, Charakterisation and Identification of a modified From of C5b consosting of three Polypeotide Chains
J. Immunology 120 (6) 1978 2008 - 2015

LEBENSLAUF

Name	Tilmann Martin Kirschner
Geburtsdatum/-ort	16. Juli 1959 in Esslingen/Neckar
Wohnort	Bilfingerstr. 12a, 7149 Freiberg/Neckar
1966 – 1969	Grundschule in Freiberg-Geisingen
1969 – 1978	Friedrich-Schiller-Gymnasium in Ludwigsburg
1978	Abitur
1978 – 1979	Zivildienst
1979 – 1985	Medizinstudium an der Universität Tübingen
1985 – 1986	Praktisches Jahr am Kreiskrankenhaus Reutlingen
28. April 1986	Staatsexamen
seit 1. Juni 1986	Assistenzarzt an der Frauenklinik des Reutlinger Kreiskrankenhauses